

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-506594

(43) 公表日 平成9年(1997)6月30日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
A 6 1 K 38/00	A D U	9051-4C	A 6 1 K 37/02	A D U
38/21	A B A	9284-4C	39/395	L
38/22	A B L	8415-4C	45/00	A B C
38/27	A B G	8415-4C	45/05	A G B
38/48	A A B	8415-4C	45/08	A C B
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 203 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-516363	(71) 出願人	ネオルクス コーポレーション アメリカ合衆国、ワシントン州 98119、 シアトル、ウェスト ハリソン 410
(86) (22) 出願日	平成6年(1994)12月7日	(72) 発明者	セオドアー ルイス ジェー アメリカ合衆国、ワシントン州 98037、 リーンウッド、アハンドレッドフィフティ セカンド プレイス エス ダブリュ 622
(85) 翻訳文提出日	平成8年(1996)6月7日	(72) 発明者	メイヤー デイマン エル アメリカ合衆国、ワシントン州 98006、 ベルエビュール、フィフティーナインス ス トリート エス イー 13409
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 4 / 1 4 1 7 4	(74) 代理人	弁理士 塩澤 寿夫 (外1名) 最終頁に続く
(87) 国際公開番号	W O 9 5 / 1 5 9 7 9		
(87) 国際公開日	平成7年(1995)6月15日		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 1 6 3 , 1 8 8		
(32) 優先日	1993年12月7日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(81) 指定国	E P (A T , B E , C H , D E , D K , E S , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , C A , J P		

(54) 【発明の名称】 プレターゲティング方法及び化合物

(57) 【要約】

診断及び治療薬剤のターゲットデリバリーに関する方法、化合物、組成物及びキットを開示する。

【特許請求の範囲】

1 哺乳類レシピエント内のターゲット細胞部位における高毒性活性薬剤の局在化を増加させる方法であって、

ターゲット部分とリガンドーアンチリガンド結合対の1員とを含む第1の包含体をレシピエントに投与し、

次いでこのレシピエントに、パリトキシシン、トリコテセン、シェウドモナス (*Pseudomonas*) 菌体外毒素、腫瘍壊疽因子、インターロイキン2、形質転換成長因子 β 、インターロイキン4、インターロイキン10、インターフェロン γ 、インターフェロン α 、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、及び顆粒球コロニー刺激因子からなる群から選ばれる高毒性活性薬剤とリガンドーアンチリガンド結合対の1員とを含む第2の包含体を投与する（但し、この第2の包含体の結合対の一員は第1の包含体のそれと相補的である）ことを含む方法。

2 さらに前記レシピエントに、循環する第1の抱合体を肝細胞レセプターに向かわせることができるクリアリング剤を投与し、それにより、循環する第1の抱合体の量を第2の抱合体の投与前に減少させる請求項1の方法。

3 第1の抱合体がアンチリガンドを含み、かつ第2の抱合体がリガンドを含む請求項1の方法。

4 第1の抱合体がストレプトアビジンを含み、かつ第2の抱合体がビオチンを含む請求項3の方法。

5 第1の抱合体の投与前、投与と同時にまたは投与に次いで、レシピエントの内因性のビオチンのレベルを減少させることをさらに含む請求項4の方法。

6 第1の抱合体がリガンドを含み、かつ第2の抱合体がアンチリガンドを含む請求項1の方法。

7 第1の抱合体がビオチンを含み、かつ第2の抱合体がストレプトアビジンを含む請求項6の方法。

8 ターゲット部分がモノクローナル抗体又はその抗原認識フラグメントであって、前記フラグメントがNR-LU-10抗体により認識される抗原と反応性を有する請求項1の方法。

9 哺乳類レシピエント内のターゲット細胞部位における活性薬剤の局在化を増加させる方法であって、

交差反応性の第1のパターンを有する第1の抗体種とリガンド-アンチリガンド結合対の1員とを含む第1のターゲッティング部分包含体をレシピエントに投与し、

次いでこのレシピエントに、1つ以上の追加のターゲッティング部分包含体、そのような追加の包含体はそれぞれ(1)第1の抗体種と異なり、かつお互いに異なる抗体種(そのような各追加の抱合体はお互いに交差反応性の第1のパターンが実質的に重複せず、かつ第1のパターンの交差反応性とも実質的に重複しない)と(2)第1の抱合体に含まれるリガンド-アンチリガンド結合対の1員とを含む、を投与し、かつ

次いでこのレシピエントに、活性薬剤とリガンド-アンチリガンド結合対の1員とを含む活性薬剤包含体を投与する(但し、この活性薬剤包含体の結合対の一員は第1の包含体のそれと相補的である)ことを含む方法。

10 さらに前記レシピエントに、1つ以上の第1のターゲッティング部分抱合体を肝細胞レセプターに向かわせることができるクリアリング剤を投与し、それにより、循環するターゲッティング部分抱合体の量を活性薬剤抱合体の投与前に減少させる請求項9の方法。

11 第1の抱合体がアンチリガンドを含み、かつ第2の抱合体がリガンドを含む

請求項9の方法。

12 第1の抱合体がstreptavidinを含み、かつ第2の抱合体がbiotinを含む請求項11の方法。

13 第1ターゲッティング部分抱合体の投与前、投与と同時にまたは投与に次いで、レシピエントの内因性のbiotinのレベルを減少させることをさらに含む請求項12の方法。

14 第1の抱合体がリガンドを含み、かつ第2の抱合体がアンチリガンドを含む請求項9の方法。

15 第1の抱合体がbiotinを含み、かつ第2の抱合体がstreptavidinを

含む請求項14の方法。

16 ターゲット部分がモノクローナル抗体又はその抗原認識フラグメントであって、前記フラグメントがNR-LU-10抗体により認識される抗原と反応性を有する請求項10の方法。

17 哺乳類レシピエント内のターゲット細胞部位における感光性活性薬剤の局在化を増加させる方法であって、

ターゲット部分とリガンドーアンチリガンド結合対の1員とを含む第1の包含体をレシピエントに投与し（但し、第1の包含体はターゲット部位に局在化する）、かつ

次いでこのレシピエントに、感光性活性薬剤とリガンドーアンチリガンド結合対の1員とを含む第2の包含体に投与する（但し、この第2の包含体の結合対の一員は第1の包含体のそれと相補的であり、かつ感光性活性薬剤または第2の包含体はそれらの迅速なレシピエントからの腎臓クリアランスを誘発するために化学的に修飾されている）ことを含む方法。

18 感光性活性薬剤が約600～約800nmの範囲の波長で光を吸収する請求項17の方法。

19 感光性活性薬剤が600～700nmに強い吸収帯を有するポルフィリン誘導体、アルミニウムまたは亜鉛とキレートしたフタロシアニン、ポルフィリンのエーテル／エステル誘導体、クロリン類、プルプリン類、及びベンゾポルフィリン誘導体からなる群から選ばれる請求項17の方法。

20 感光性活性薬剤がクロリンである請求項19の方法。

21 さらに前記レシピエントに、循環する第1の抱合体を肝細胞レセプターに向かわせることができるクリアリング剤を投与し、それにより、循環する第1の抱合体の量を第2の抱合体の投与前に減少させる請求項17の方法。

22 第1の抱合体がアンチリガンドを含み、かつ第2の抱合体がリガンドを含む請求項17の方法。

23 第1の抱合体がストレプトアビジンを含み、かつ第2の抱合体がビオチンを含む請求項22の方法。

24 第1ターゲッティング部分抱合体の投与前、投与と同時にまたは投与に次いで、レシピエントの内因性のビオチンのレベルを減少させることをさらに含む請求項23の方法。

25 第1の抱合体がリガンドを含み、かつ第2の抱合体がアンチリガンドを含む請求項17の方法。

26 第1の抱合体がビオチンを含み、かつ第2の抱合体がストレプトアビジンを含む請求項25の方法。

27 ターゲット部分がモノクローナル抗体又はその抗原認識フラグメントであって、前記フラグメントがNR-LU-10抗体により認識される抗原と反応性を有する請求項17の方法。

28 リガンドまたはアンチリガンドと結合したターゲッティング部分を含む抱合体の投与、及び第1の抱合体に含まれるリガンドまたはアンチリガンドと結合し、かつ活性薬剤と直接又は間接に結合するリガンドまたはアンチリガンドを含む第2の抱合体を同時に又は次いで投与することを含む改良された治療方法であって、

前記改良が、第1又は第2の抱合体に含まれる少なくともリガンド、アンチリガンド、ターゲッティング部分または活性薬剤への1つ以上のポリアルキレングリコール残基の結合を含む方法。

29 第1又は第2の抱合体がポリアルキレングリコール誘導化ストレプトアビジンまたはアビジンを含む請求項28の方法。

30 前記ポリアルキレングリコールが1～20の炭素原子を含む請求項28の方法。

31 前記ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールを含む請求項30の方法。

32 前記ポリアルキレングリコール残基がアビジン又はストレプトアビジン分子に含まれるビオチン結合部位の保護の後に結合される請求項28の方法。

33 前記保護をアビジン又はストレプトアビジン分子とビオチン結合部位に可逆的に結合する分子との反応により行う請求項32の方法。

34 前記分子がイミノビオチンである請求項33の方法。

35 ポリアルキレングリコール誘導化ストレプトアビジン若しくはアビジン分子または天然ストレプトアビジン若しくはアビジン分子より弱い免疫原性を示し、かつビオチン結合能力を保持している前記誘導化アビジン若しくはストレプトアビジン分子を含む抱合体。

36 前記ポリアルキレングリコールが1～20の炭素原子を含む請求項35の誘導化ストレプトアビジンまたはアビジン。

37 前記ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールを含む請求項35の誘導化ストレプトアビジンまたはアビジン。

38 血栓溶解治療の改善された方法であって、

(i) 血栓に対するターゲッティングのために提供されるターゲッティング部分に直接または間接的に結合するリガンドまたはアンチリガンドを含む第1のプレターゲッティング抱合体を投与し、かつ

(ii) 第1の抱合体中のリガンドまたはアンチリガンドと相補的なリガンドまたはアンチリガンドと直接または間接的に結合する血栓溶解薬剤を含む第1の抱合体と特異的に結合する第2の抱合体の治療有効量を投与することを含む方法。

39 前記方法が第1または第2の抱合体のいずれかと生体内(in vivo)複合化できるクリアランス指向部分の投与も含む請求項11の方法。

40 ターゲッティング部分がアネキシン（活性化血小板と結合する抗体である）またはアンチフィブリン抗体である請求項38の方法。

41 血栓溶解薬剤がt-PAウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、またはそれらのハ

イブリッド、誘導体若しくは突然変異体である請求項38の方法。

42 クリアランス指向部分がさらにヘキソース残基を含む請求項39の方法。

43 クリアランス指向部分がガラクトース残基を含む請求項42の方法。

44 ターゲット生体内(in vivo)部位でのシトキンのより効果的な利用を提供する方法であって、

(i) ターゲット細胞に対する（ターゲッティング部分）－（リガンドまたはアン

チリガンド) - (アンチリガンドまたはリガンド) - シトキン複合体の特異的結合を生じる1つ以上の部分を投与し、かつ

(ii)次いで、ターゲット部位における遊離のシトキンの解離の用意をするに十分な量のリガンドまたはアンチリガンドを投与する方法。

45 シトキンがインターフェロン、インターロイキン、コロニー刺激因子及び腫瘍壊疽因子から選ばれる請求項44の方法。

46 シトキンが腫瘍壊疽因子である請求項45の方法。

47 複合体に含まれるリガンドがビオチンまたは低親和性ビオチンアナログであり、かつアンチリガンドがアビジンまたはストレプトアビジンであり、かつ解離がビオチンまたは低親和性ビオチンアナログの投与により行われる請求項45の方法。

48 段階(i)がシトキン治療を必要とする患者に前記複合体を投与することにより行われる請求項45の方法。

49 (i) (リガンドまたはアンチリガンド) - ターゲッティング部分包含体を含む第1の包含体を投与し、かつ

(ii) (リガンドまたはアンチリガンド) - 放射性キレート包含体を含む第2の包含体の治療効果量を投与する方法であって、放射性キレート及びリガンドまたはアンチリガンドが開裂可能なリンカーにより分離されている放射性免疫治療方法。

50 リンカーが塩基性条件下で開裂可能である請求項49の方法。

51 リンカーが開裂可能エステルを含む請求項49の方法。

52 開裂可能エステルがコハク酸セリルまたはアルキルエステルである請求項49の方法。

53 ビオチンアミド - N - メチルグリシル - セリル - O - スクシンアミド - ペンシル D O T A。

【発明の詳細な説明】**プレターゲティング方法及び化合物****技術的分野**

本発明は、リガンド／アンチリガンド対の一方に結合しているターゲティング（標的指向）部分をターゲット（標的）部位にデリバリーするために有用な方法、化合物、組成物及びキットに関する。ターゲティング部分抱合体の局在化（ローカライゼーション）及びクリアランス後に、診断薬抱合体または治療薬抱合体を直接または間接にターゲット部位に結合させる。

発明の背景

従来の癌療法には解決を要する2つの問題がある。一般的に達成可能なターゲティング比（腫瘍に局在化する投与薬量対血液中に循環する投与薬量の比、または腫瘍に局在化する投与薬量対骨髄に移行する投与薬量の比）は低い。また、多くの症例では、腫瘍にデリバリーされる放射線または治療薬の絶対量は有意な腫瘍応答を誘発するために十分でない。腫瘍に対するターゲティング比または絶対量の向上が求められてる。

発明の概要

本発明は、診断用及び治療用のプレターゲティング方法、該方法に有用な部分(moieties)及びこれらの部分の製造方法に関する。かかるプレターゲティング方法は、従来の癌療法と比較してターゲット細胞部位に対するターゲティング比が向上するかまたは絶対量が増加することを特徴とする。

本発明はパリトキシンのような高毒性部分を含む、毒素、細菌毒、真菌毒のような細胞障害性活性薬剤の効果的なデリバリーを提供する。ターゲッティング部分（一般に遅い）と活性薬剤（単独で投与された場合、低分子量活性薬剤については一般に速く、比較的高分子量の活性薬剤については一般に幾分遅い）の薬物動態学の分離及びリガンド－アンチリガンド対の高親和性結合がこの改良を提供

する。投与されるべき活性薬剤または活性薬剤－リガンドまたは活性薬剤－アンチリガンド抱合体がそれ自身は一般に迅速にクリアされない場合、そのような活性薬剤を含有する抱合体は、比較的速い、好ましくはそれに対する腎クリアラン

スを付与するように構成され、または活性薬剤は低い治療効果的投与量で投与される。従って、プロトコルレシピエントの非ターゲット組織は、活性薬剤に対する長期間の暴露を受けない。

本発明は、以下に記載する段階を利用する２段階及び３段階プレターゲティング法を提供する。

交差反応性の第１のパターンを有する第１の抗体種の抗体ターゲットとリガンド-アンチリガンド結合対の１員とを含む包含体をレシピエントに投与し、かつこのレシピエントに、１つ以上の追加のターゲッティング包含体及び第１の抱合体に結合するリガンド-アンチリガンド結合対の１員とを投与する（但し、そのような各包含体は、第１の抱合体の種と異なる種の抗体ターゲッティング部分を含み、かつお互いが他の追加のターゲッティング抱合体と、及びお互いに、及び交差反応性の第１のパターンと、実質的に重複しない交差反応性のパターンを有する）。

抱合体のこれらの態様を実施する場合、活性薬剤抱合体レセプター（即ち、第１の抗体種及び追加のターゲッティング抗体種に結合したリガンドまたはアンチリガンド）のターゲット部位付着(accretion)が改良される。何故なら、各抗体種はターゲット部位に結合した異なるエピトープを認識するからである。この代替エピトープ法は、高親和性リガンド-アンチリガンド相互作用を介して次に投与される活性薬剤含有抱合体が結合するアンチリガンドまたはリガンド抗原がより高密度で存在するターゲット部位を提供する。この増大したターゲット部位抗原密度は、それに対する活性薬剤の付着の増大を促進する。本発明は、以下に記載するプレターゲティング光力学的治療プロトコルも提供する。

２段階法は

ターゲット部分とリガンド-アンチリガンド結合対の１員とを含む第１の包含体をレシピエントに投与し（但し、第１の包含体はターゲット部位に局在化する）、

任意に、このレシピエントに循環する抱合体のレシピエントからのクリアランスに向けられるクリアリング剤を投与するか、またはこのレシピエントをクリア

リング装置若しくは代替のクリアリング手順で処置してレシピエントから循環する抱合体を実質的に除去し、かつ

このレシピエントに、感光性活性薬剤とリガンドーアンチリガンド結合対の1員とを含む第2の抱合体に投与する（但し、この第2の抱合体の結合対の一員は第1の抱合体のそれと相補的であり、かつ感光性活性薬剤または第2の抱合体はそれらの迅速なレシピエントからの、好ましくは腎臓クリアランスを誘発するために化学的に修飾されている）ことを含む。

上記任意のクリアランス段階の1つの代替法は、単に、レシピエントの本来のクリアランスを機能させるに十分な時間を経過させて循環する第1の抱合体を実質的に除去することである。

3段階法は

ターゲット部分とリガンドとを含む第1の抱合体をレシピエントに投与し（但し、このターゲット部分ーリガンド抱合体はターゲット部位に局在化する）、

このレシピエントに、リガンドと感光性薬剤とを含む第2の抱合体を投与する（但し、この感光性薬剤または第2の抱合体はそれらの迅速なレシピエントからの、好ましくは腎臓クリアランスを誘発するために化学的に修飾されており、かつターゲット部位における第2の抱合体の局在化が第1の抱合体の前もった局在化の結果として強化される）ことを含む。

抱合体の上記2段階及び3段階プレターゲットティング法はレシピエント内因性ビオチンの存在に係わらず行うことができるが、本発明は内因性ビオチンレベルまたはその衝撃を減少させる方法も提供する。1つの方法は、高投与量のターゲットティング部分ーstreptavidinまたはavidin抱合体で内因性ビオチンを覆うことである。別の方法は、レシピエントの内因性ビオチンの実質的に全てと結合するに十分な量のavidinで前もって処置する方法である。この方法を行う場合、avidinは静脈、経口または浣腸により投与できる。あるいは、レシピエントは2段階及び3段階プレターゲットティングプロトコルを行う前にビオチンを含まない規定食を取ることができる。内因性ビオチンに関する他の方法は、経口非吸

収性抗生物質を用いることである。

インターロイキン類（例えば、IL-2及びIL-4）、コロニー形成刺激因子（例えば、GM-CSF）、インターフェロン類（例えば、インターフェロン- γ ）及び腫瘍壊疽因子(TNF)のようなシトキン類は、本発明の2段階又は3段階プレターゲットティングプロトコルの実施において抗腫瘍活性薬剤として使用できる。さらに、本発明のプレターゲットティングプロトコルは追加の条件に関して複数の応用を有する。TGF- β のような免疫抑制シトキン類は、例えば、リュウマチ様関節炎、全身性エリテマトーデス、インスリン依存性糖尿病、多発性硬化症、肺繊維症等の自己免疫疾患の治療、例えば、移植片対宿主反応の予防または防止等の肝臓及び腎臓組織中の組織移植促進に使用できる。

図面の簡単な説明

図1はアビジンの静脈内投与後のビオチン化抗体の血中クリアランスを示す。

図2は、3段階プレターゲットティングプロトコルにおける放射性レニウムの腫瘍内取込みを、放射性標識抗体（従来から使用されているキレート化放射性レニウムに共有結合した抗体）投与と比較して示す。

図3は、NR-LU-10-ストレプトアビジン抱合体(LU-10-StrAv)の腫瘍内取込みプロフィールを、対照として用いた天然型NR-LU-10完全抗体のプロフィールと比較して示す。

図4は、NR-LU-10-ストレプトアビジン抱合体の腫瘍内取込み及び血中クリアランスプロフィールを示す。

図5は、オロソムコイドと比較して、アシアロオロソムコイドの迅速な血中クリアランスをI-125-標識タンパク質の注入用量の%として示す。

図6は、オロソムコイドと比較して、アシアロオロソムコイドの5分間の限定生体内分布をI-125-標識タンパク質の注入用量の%として示す。

図7は、3種類の対照(○、●、■)及びクリアリング剤の2種類の用量(□(小さい)、□(大きい))を投与したときの抱合体投与の25時間後のNR-LU-10-ストレプトアビジン抱合体の血中クリアランスを示す。

図8は、3種類の対照(グループ1、2及び5)及びクリアリング剤の2種類の用量(グループ3及び4)を投与したときのクリアリング剤投与の2時間後の

LU-10-StrAv抱合体の限定生体内分布データを示す。

図9は、クリアリング剤投与の2時間後のNR-LU-10-ストレプトアビジン抱合体の血清ビオチン結合能力を示す。

図10は、対照(○)及びクリアリング剤の3種類の用量(▽、△、□)を投与したときの抱合体投与の24時間後のNR-LU-10-ストレプトアビジン抱合体の経時的血中クリアランスを示す。

図11Aは、対照(PBS)及びクリアリング剤の3種類の用量(50、20及び10 μ g)を投与したときのクリアリング剤投与の2時間後のLU-10-StrAv抱合体の血中クリアランスを示す。

図11Bは、対照(PBS)及びクリアリング剤の3種類の用量(50、20及び10 μ g)を投与したときのクリアリング剤投与の2時間後のLU-10-StrAv抱合体の血清ビオチン結合能力を示す。

発明の詳細な説明

本発明を説明する前に、本文中で使用したいいくつかの用語を定義しておくのが有用であろう。

ターゲティング部分：所定の細胞集団に結合する分子。ターゲティング部分は、レセプター、オリゴヌクレオチド、酵素基質、抗原決定基、またはターゲット細胞集団上もしくは該集団内に存在する他の結合部位に結合し得る。本明細書の記載ではターゲティング部分の典型例として抗体を使用している。抗体クラゲメント及び発現された抗原を認識できる小さいペプチド配列も、本発明のターゲティング部分に含まれる。また、本発明の説明においてターゲットの典型例として腫瘍を使用している。

リガンド/アンチリガンド対：一般に比較的高い親和性の特異的結合を示す相補性/アンチ相補性分子対。典型的なリガンド/アンチリガンド対としては、ジンクフィンガータンパク質/dsDNAフラグメント、酵素/阻害物質、ハプテン/抗体、レクチン/糖質、リガンド/レセプター、及びビオチン/アビジンがある。本明細書の記載ではリガンド/アンチリガンド対の典型例としてビオチン/アビ

ジンを使用している。

アンチリガンド：本文中に定義された「アンチリガンド」は、相補性リガンドと高親和性結合、好ましくは多価結合する分子を意味する。急激な腎クリアランスを防止するようにアンチリガンドが十分に大きく、また、ターゲティング部分-リガンド抱合体の架橋及び凝集を得るために十分な高価数のものが好ましいが、一価のアンチリガンドも本発明の対象となる。本発明のアンチリガンドは、例えば肝取込みを指令するガラクトース残基のように、その取込みを指令する構造的な特徴を示すかまたは示すように誘導体化され得る。本明細書では典型的なアンチリガンドとしてアビジン及びストレプトアビジンを使用している。

アビジン：本文中で定義された「アビジン」なる用語は、アビジン、ストレプトアビジン、または、ビオチンと高親和性の多価結合または一価結合を生じ得るその誘導体もしくは類似体を包含する。

リガンド：本文中で定義された「リガンド」なる用語は、動物またはヒトに静脈内投与されたとき迅速な血清、血中及び/または全身クリアランスを示す比較的小さい可溶性分子を意味する。典型的なリガンドとしてビオチンを使用している。

活性薬剤：放射性核種、薬物、抗腫瘍剤、毒素などのような診断薬または治療薬（「ペイロード」）。典型的な活性薬剤として放射性核種治療薬を使用している。

NxSyキレート：本文中で定義された「NxSyキレート」なる用語は、(i) 金属または放射性金属と配位結合することができ、且つ、(ii) ターゲティング部分、リガンドまたはアンチリガンドに共有結合し得る二官能(buoy)キレート化剤を意味する。特に好ましいNxSyキレートは N_2S_2 及び N_3S コアを有している。代表的なNxSyキレートは、例えばFritzberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4024-29, 1988; Weber et al., Bioconj. Chem. 1:431-37, 1990; 及びこれらの引用文献に記載されている。

プレターゲティング(Pretargeting)：本文中で定義されたプレターゲティングなる用語は、リガンド/アンチリガンド対の一方に結合したターゲティング部分をターゲット部位に局在化させることを意味する。このターゲティング部分抱合

体の最適のターゲット対非ターゲット蓄積比が生じる十分な時間が経過した後、リガンド/アンチリガンド対の他方に結合した活性薬剤を投与し、ターゲット部位においてターゲティング部分抱合体に（直接または間接的に）結合させる（2段階プレターゲティング）。本文中に記載した3段階方法及び他の関連方法も本発明に包含される。

クリアリング剤 (clearing agent)：レシピエントの循環中に存在する被投与部分（例えば、ターゲティング部分-リガンド、ターゲティング部分-アンチリガンドまたはアンチリガンド単独）と結合、錯化または他の方法で結合することができ、これによって、レシピエントの体内からの循環部分のクリアランス、血液循環からの除去または循環中の部分の不活性化を容易にする物質を意味する。クリアリング剤は、クリアリング剤と同じ処理プロトコルで使用されるターゲティング部分によって認識されるターゲット細胞集団へのクリアリング剤の接近を制限する物理的特性、例えば、大きさ、電荷、立体配置またはその組合わせを特徴とすることが好ましい。

ターゲット細胞滞留：放射性核種又は他の治療薬がターゲット細胞表面又はターゲット細胞内に滞留する時間。抱合体又は治療薬を含む分子の分解作用はターゲット細胞滞留の損失に主に関係があると思われる。

抱合体 (Conjugate)：抱合体は、化学的抱合体（共有結合または非共有結合）、融合タンパク質などを包含する。

造影または治療のためのターゲティング部分-放射性同位元素抱合体の in vivo 投与に関して判明した欠点は、結合させた放射性薬剤が非ターゲット部位及びターゲット部位の双方に局在化することである。投与された放射性標識抱合体が循環からクリアされるまでに、正常な器官及び組織が結合させた放射性物質によって一時的に被曝される。例えば、in vivoで投与された放射性標識完全抗体は、比較的緩慢な血中クリアランスを示す。最大のターゲット部位局在化は通常は投与の1～3日後に生じる。概して、抱合体の血中クリアランス時間が長い程、非ターゲット器官の放射能被曝が大きい。

これらの特性はヒトの放射線免疫療法で特に問題となる。ヒトの臨床試験では、完全抗体に結合した放射性同位元素の循環半減期が長いと、全身にデリバリー

さ

れる放射線量が比較的大きくなる。特に、極めて放射線感受性の高い骨髄は非特異的毒性の用量制限器官である。

非ターゲット組織の放射性同位元素被曝を少なくするために、可能性のあるターゲットティング部分を広くスクリーニングして、非ターゲット反応性が最小でありしかもターゲット特異性及び反応性を維持しているものを同定した。非ターゲットの被曝（及び非ターゲットへの局在化及び/または毒性などの副作用）を抑制することによって、放射線治療用抱合体の投与量を増加し得る。さらに、放射線診断用抱合体の非ターゲット蓄積が減少するのでバックグラウンドとターゲットとのコントラストが向上する。

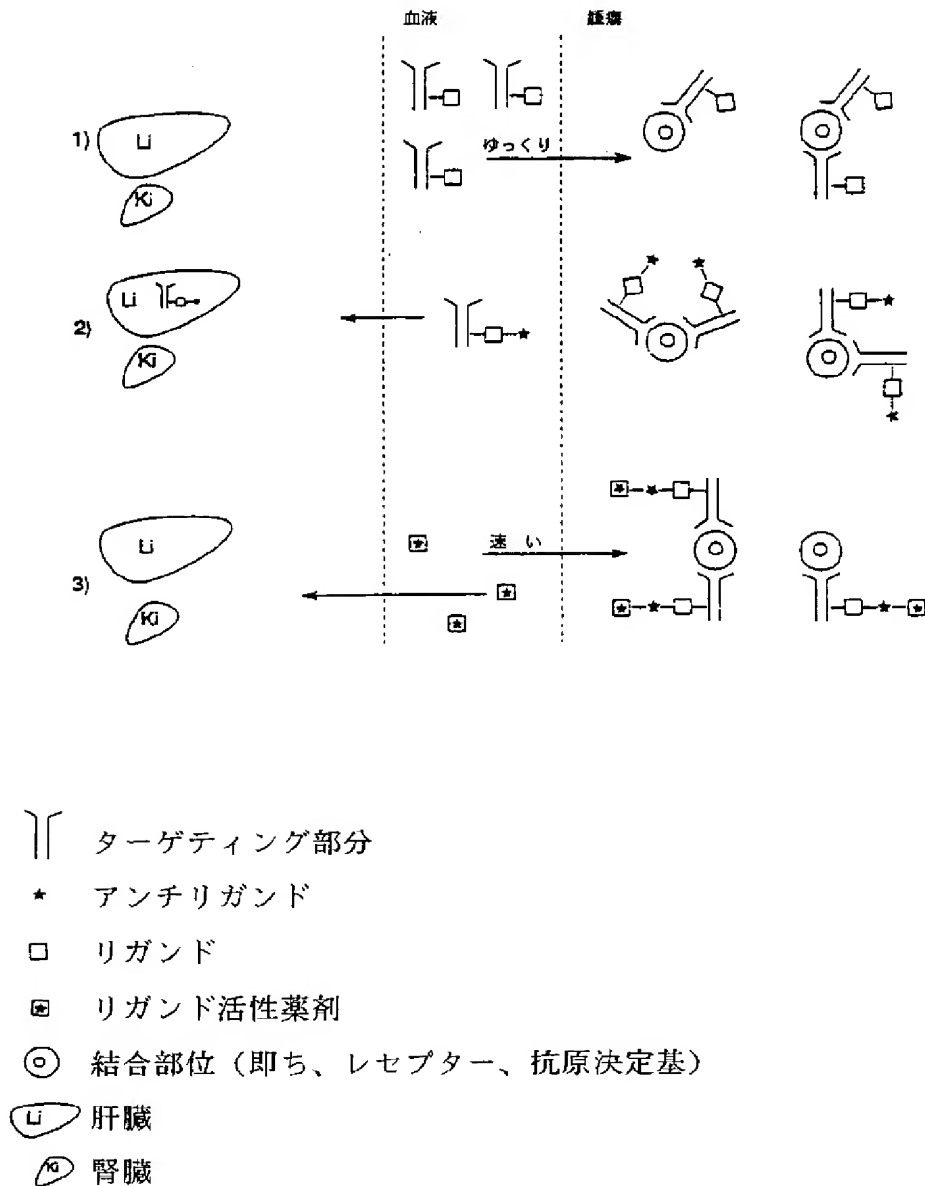
単独で投与されるかまたはターゲットティング部分との抱合体として投与される治療薬も同様の欠点を有している。この場合にも目的は、（非ターゲット組織の被曝に起因する）正常器官の毒性を許容可能限界値未満に維持しながら、（ターゲット組織を最大に照射する）最大可能濃度の薬剤を投与することである。しかしながら、放射性同位元素と違って治療薬は、細胞毒性効果を発揮するためにはターゲット細胞に取込まれなければならない。ターゲットティング部分-治療薬抱合体の場合、比較的ターゲット特異的なターゲットティング部分と、ターゲットティング部分-薬剤抱合体のターゲット細胞内インターナリゼーションを増進させる手段とを組み合わせるのが有利であろう。

これに対し、診断薬-ターゲットティング部分抱合体を投与する場合には、ターゲット細胞内インターナリゼーションの増進は好ましくない。診断用抱合体のインターナリゼーションにより、抱合体の細胞性異化及び分解が生じる。このような分解が生じると、診断薬の小さい付加化合物または診断薬自体が細胞から放出され、従って、ターゲット特異的に抱合体を検出する能力が失われる。

非ターゲット組織の診断薬または治療薬への曝露を減少させる1つの方法は、ターゲットティング部分をターゲット部位に「プレターゲットティング」し、次いで、ターゲット部位に「プレターゲットティングされた」ターゲットティング部分に結合し得るクリアランスの速い診断薬または治療薬抱合体を投与することである。いくつ

かのプレターゲティング方法の実施態様が米国特許第4,863,713号 (Goodwin et al.) に記載されている。

代表的なプレターゲティング方法（「3段階」）を以下に概略的に示す。



要するに、この3段階プレターゲティングプロトコルは、ターゲット部位に局在させ循環中では希釈されることが可能な抗体-リガンド抱合体を投与することの特徴とする。その後投与されるアンチリガンドが抗体-リガンド抱合体に結

合し、未結合の抗体-リガンド抱合体を血中からクリアする。好ましいアンチリガンドは、循環する抗体-リガンド抱合体の架橋及び凝集が得られるように十分に大きくまた十分に高い価数を有する。アンチリガンドによるクリアリングはおそらく、血液中に循環する抗体-リガンド抱合体がアンチリガンドと架橋及び/または凝集し、その結果としてレシピエントのRES（細網内皮系）による複合体/凝集物クリアランスが生じるためであろう。この種のアンチリガンドクリアランスは好ましくは多価分子によって得られるが、それ自体RESによってクリアされる十分な大きさをもつ一価の分子も使用できよう。あるいは、アシュウェル(Ashwell)レセプターのようなレセプターに基づくクリアランスメカニズム、またはガラクトースもしくはマンノース残基などのヘキソース残基認識メカニズムもアンチリガンドクリアランスを担うことができるであろう。このようなクリアランスメカニズムは、RES複合体/凝集物クリアランスメカニズムよりも、リガンドに対するアンチリガンドの価数に対する依存性がより小さい。リガンド-アンチリガンド対が比較的高親和性の結合を示すことが好ましい。

次に、迅速な全身クリアランスを示す診断薬-または治療薬-リガンド抱合体を投与する。循環によって活性薬剤-リガンド抱合体がターゲット細胞結合抗体-リガンド-アンチリガンド複合体の近傍に運ばれると、アンチリガンドが循環中の活性薬剤-リガンド抱合体に結合し、ターゲット部位に抗体-リガンド：アンチリガンド：リガンド-活性薬剤の「サンドイッチ」を生じさせる。診断薬または治療薬は、（抗体、抗体フラグメントまたは他の緩慢にクリアされるターゲティング部分よりも）迅速にクリアされるリガンドに結合しているので、この方法では非ターゲットの活性薬剤に対する暴露が抑制される。

代替的なプレターゲティング方法では、アンチリガンドクリアリング剤の非経口投与段階が削除される。これらの「2段階」手順は、ターゲティング部分-リガンドまたはターゲティング部分-アンチリガンドを投与し、次いでリガンド-アンチリガンド対の他方と抱合体を形成している活性薬剤を投与することを特徴とする。本発明の2段階プレターゲティング方法の任意の「1.5」段階として、（好ましくはリガンドまたはアンチリガンド単独でない）クリアリング剤を投与して、循環中のターゲティング部分含有抱合体のクリアランスを容易にする。

2段階プレターゲティング方法において、クリアリング剤は、ターゲット細胞集団に直接結合することもなく、予め投与されターゲット細胞に結合したターゲティング部分-アンチリガンド抱合体またはターゲティング部分-リガンド抱合体を介して結合することもないものであることが好ましい。2段階プレターゲティングの一例では、アビジン-ターゲティング部分抱合体のクリアリング剤として、ビオチン化ヒトトランスフェリンを使用する。このクリアリング剤は、トランスフェリン-ビオチン-循環アビジン-ターゲティング部分複合体の肝クリアランスを生じさせる大きさを有しており、ターゲット細胞部位に結合したアビジン-ターゲティング部分抱合体との結合は実質的に阻止される (Goodwin, D.A., Antibod. Immunconj. Radiopharm., 4:427-34, 1991参照)。

2段階プレターゲティング方法は、3段階のプレターゲットプロトコルにおけるクリアリング剤の使用に関連するいくつかの欠点を克服する。より具体的には、動物モデルで得られたデータは、プレターゲットされたターゲティング部分-リガンド抱合体 (即ち、細胞に結合した抱合体) に対する in vivo のアンチリガンド結合が、ターゲット細胞からターゲティング部分-リガンド抱合体を除去することを示している。この観察された現象の1つの解釈としては、多価アンチリガンドが細胞表面でターゲティング部分-リガンド抱合体と架橋し、これにより生じた複合体のインターナリゼーションが開始されるかまたは容易になるためであると説明できる。ターゲティング部分-リガンドの細胞からの明らかな損失は、抱合体の内部分解及び/または (細胞表面または細胞内部における) 活性薬剤の抱合体からの遊離によるものであるかもしれない。観察された現象の別の解釈としては、ターゲット細胞の膜透過率の変化がターゲット細胞内への分子の受動拡散を増加させるためであると説明できる。同様に、ターゲティング部分-リガンドがある程度失われるのは、別の部分がその後にターゲティング部分-リガンドに後で結合するので親和性が変質するためであり得る。例えば、抗-イディオタイプモノクローナル抗体の結合は、腫瘍に結合したモノクローナル抗体の除去を生じる。

本発明によれば、この現象 (ターゲット細胞からのターゲティング部分-リガンドの明らかな減少) を治療薬全体の in vivo デリバリー、または特に薬剤デリ

バリーに有利に使用し得ることが判明した。例えば、ターゲティング部分をリガンド及び治療薬の双方に共有結合させ、レシピエントに投与し得る。その後投与されたアンチリガンドは、表面に結合したターゲティング部分-リガンド-治療薬の三者抱合体と架橋し、三者抱合体（従って活性薬剤）のインターナリゼーションを誘発する。あるいは、ターゲティング部分-リガンドをターゲット細胞表面にデリバリーし、次いでアンチリガンド-治療薬を投与してもよい。

本発明の1つの形態においては、ターゲティング部分-アンチリガンド抱合体を in vivo 投与する。ターゲティング部分-アンチリガンド抱合体のターゲット局在化（即ち、この抱合体の循環からのクリアランス）が生じたとき、活性薬剤-リガンド抱合体を非経口的に投与する。この方法は、（ターゲティング部分-リガンド：アンチリガンド：リガンド-活性薬剤複合体及びターゲティング部分-リガンド：アンチリガンド-活性薬剤複合体と比較して）ターゲティング部分-アンチリガンド：リガンド-活性薬剤複合体のターゲット細胞滞留を増進する。多様なリガンド/アンチリガンド対が本発明の範囲内で使用するのに適当であるが、好ましいリガンド/アンチリガンド対はビオチン/アビジンである。

本発明の第2の形態においては、放射性ヨウ素化ビオチン及び関連方法が開示される。従来の放射性ヨウ素化ビオチン誘導体は高分子量を有しており特性化するのが困難であった。本文中に記載の放射性ヨウ素化ビオチンは容易に且つ十分に特性化された低分子量化合物である。

本発明の第3の形態においては、ターゲティング部分-リガンド抱合体の in vivo 投与が開示される。ターゲティング部分-リガンド抱合体のターゲット局在化（即ち、この抱合体の循環からのクリアランス）が生じたときに、薬剤-アンチリガンド抱合体を非経口投与する。この2段階方法では、ターゲティング部分抱合体をプレターゲティングするだけでなく、後のターゲティング部分-リガンド-アンチリガンド-薬剤複合体をターゲット細胞で内部にインターナリゼーションさせる。あるいは、別の実施態様は、ターゲティング部分-リガンド：アンチリガンド；リガンド-薬剤複合体を表面に産生する3段階プロトコルを提供する。この方法では、リガンド-薬剤抱合体をアンチリガンドと同時に投与するかまたは短時間の経過後（即ち、ターゲティング部分-リガンド-アンチリガ

ド複合体がターゲット細胞表面から除去される前)に投与する。

本発明の第4の形態においては、テクネチウム-99m、レニウム-186及びレニウム-188によるビオチンの放射性標識方法が開示される。従来のビオチン誘導体は、プレターゲットされたイムノシンチグラフィーで使用するためにインジウム-111で放射性標識されていた(例えばVirzi et al., Nucl. Med. Biol. 18:719-26; Kalofonos et al., J. Nucl. Med. 31:1791-96, 1990; Paganelli et al., Canc. Res. 51:5960-66, 1991)。しかしながら、 ^{99m}Tc は、(i) 廉価であること、(ii) 供給の便がよいこと、及び(iii) 有利な核特性により特に好ましいイムノシンチグラフィー用放射性核種である。レニウム-186は ^{99m}Tc に極めて類似したキレート化学を示し、優れた治療用放射性核種であると考えられている(即ち、半減期3.7日及び ^{131}I と同様の1.07MeV最大粒子)。従って、請求の範囲に記載されたビオチンのテクネチウム及びレニウムによる放射性標識方法は多数の利点を与えるものである。

本発明の「ターゲティング部分」は、腫瘍細胞のような所定のターゲット細胞集団に結合する。この意味で有用な好ましいターゲティング部分としては、抗体、抗体フラグメント、ペプチド及びホルモンがある。既知の細胞表面レセプターに対応するタンパク質(低密度リポタンパク質、トランスフェリン及びインスリン等)、繊維素溶解酵素、抗-HER2、アネキシンのような血小板結合タンパク質、生物学的応答調節剤(インターロイキン、インターフェロン、エリスロポエチン及びコロニー形成刺激因子等)も好ましいターゲティング部分である。また、レセプターに結合後にインターナリゼーションを受けある程度まで核に達する抗-EGFレセプター抗体は、オージェ電子エミッター及び核結合薬剤をターゲット細胞核に容易にデリバリーするために本発明で使用される好ましいターゲティング部分である。オリゴヌクレオチド、例えばターゲット細胞核酸(DNAまたはRNA)の部分に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドも本発明を実施するためのターゲティング部分として有用である。細胞表面に結合するオリゴヌクレオチドも有用である。所定のターゲット細胞集団に結合する能力を維持している上記に挙げたターゲティング部分の類似体も請求の範囲に記載の発明の範囲内で使用され得る。さらに、合成ターゲティング部分も設計できる。

上記分子の機能的等価物も本発明のターゲティング部分として有用である。ターゲティング部分の機能的等価物の一例は「模倣」化合物、即ちターゲティング部分-ターゲット細胞結合のための適正な立体配置及び/または配向を模倣するように設計された有機化学的構築物である。別のターゲティング部分の機能的等価物は、コンピューター支援分子モデリング及び改変された結合親和性を有する突然変異体を用いて構築した「最小」ポリペプチドと呼ばれる短いポリペプチドである。この最小ポリペプチドはターゲティング部分の結合親和性を示す。

本発明の好ましいターゲティング部分は抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）、ペプチド、オリゴヌクレオチド等である。本発明の実施に有用なポリクローナル抗体はポリクローナル(Vial and Callahan, Univ. Mich. Med. Bull., 20:284-6, 1956)、アフィニティ精製ポリクローナルまたはそのフラグメント(Chao et al., Res. Comm. in Chem. Path. & Pharm., 9:749-61, 1974)である。

本発明の実施に有用なモノクローナル抗体は完全抗体及びそのフラグメントを包含する。このようなモノクローナル抗体及びフラグメントは、ハイブリドーマ合成、組換えDNA法及びタンパク質合成のような慣用の方法によって産生できる。有用なモノクローナル抗体及びフラグメントは、任意の種（ヒトを含む）に由来することができ、あるいは2以上の種からの配列を使用するキメラタンパク質として形成されてもよい。概要に関しては、Kohler and Milstein, Nature256:495-97, 1975; Eur. J. Immunol. 6:511-19, 1976を参照。

ヒトモノクローナル抗体または「ヒト化」ネズミ抗体も本発明のターゲティング部分として有用である。例えば欧州特許出願第0,411,893A2号に開示されたものと同様の方法を用い、例えばネズミFv領域（即ち、抗原結合部位を含有する領域）またはその相補性決定領域をコードするヌクレオチド配列を、ヒト定常ドメイン領域及びFc領域で遺伝子組換えすることによってネズミモノクローナル抗体を「ヒト化」する。適正なターゲット部位結合特性を確保するためにいくつかのネズミ残基をヒト可変領域フレームワークドメインに維持してもよい。ヒト化したターゲティング部分は、宿主レシピエント中の抗体またはポリペプチドの免疫反応性を減少させ、半減期を延長させ、且つ、不都合な免疫反応の可能性を減少

させるものと認識される。

本発明で有用な活性薬剤（診断用または治療用）の種類には、毒素、抗腫瘍薬、薬物及び放射性核種がある。本発明で使用する有効な毒素のいくつかは、A鎖及びB鎖からなる。A鎖は細胞障害性部分であり、B鎖は在来毒素分子（ホロトキシン）のレセプター結合部分である。毒素B鎖は非ターゲット細胞結合を媒介するので、毒素A鎖だけをターゲティングタンパク質に結合させるのが有利な場合が多い。しかし、毒素B鎖の除去は非特異的細胞毒性を減少させることはできるが、一般的な傾向として、対応するホロトキシン-ターゲティングタンパク質抱合体と比較して毒素A鎖-ターゲティングタンパク質抱合体の効力の減少を招く。

この点に関して好ましい毒素は、アブリン、リシン、モデシン(modeccin)、シュードモナス(Pseudomonas)菌体外毒素A、ジフテリア(Diphtheria)毒素、百日咳毒素及び志賀毒素のようなホロトキシン；リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、シュードモナス菌体外毒素Aの酵素部分、ジフテリア毒素A鎖、百日咳毒素の酵素部分、志賀毒素の酵素部分、ゼロニン(gelonin)、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サボリン(saporin)、トリチン(tritin)、大麦毒素及びヘビ毒ペプチドのようなA鎖または「A鎖様」分子である。リボソーム不活性化タンパク質(RIP)、転位及び細胞結合能力の欠如した天然タンパク質合成阻害物質も本発明に適宜使用し得る。パリトキシン(palytoxin)のような極めて毒性の高い毒素も本発明の実施に有用であると考えられる。

パリトキシン、ブロック(blocked)リシン（米国特許第5,239,062号参照）、シュウドモナス菌体外毒素等の細菌毒素、ジフテリア毒素、トリコテセン類（例えばロリジンA及びベルカリンA）等の真菌二次代謝産物毒素、のような特に高毒性の毒素、及びアクチノマイシンD等の増強化学療法剤のような他の高毒性の毒素も本発明の実施に使用することができる。そのような特に高毒性の分子はマイクロモルやピコモル濃度で毒性を示す。

例えば、保護された遊離の末端アミノ基を有するパリトキシン分子は、そのような遊離のアミンを有さないパリトキシン誘導体の約500倍の毒性を有する。猿では、約80ng/kgのLD50を有することが見いだされた。従って、アミノ誘導化

パリトキシン分子は、約 $40 \mu\text{g/kg}$ の i.v. LD50 を有すると予想される。パリトキシンは特に高毒性により特徴付けられる典型分子としてここに記載する。パリトキシンは膜活性薬剤の模範例としてもここに記載する。膜活性薬剤の他の例は、アンホテリシンB、ポリミキシンB 等である。

従来のターゲット治療においては、活性薬剤が抗体または投与されるべき治療抱合体に結合し、投与されるべき診断または治療抱合体を形成する。ターゲット部位への活性薬剤の付着は、従って、ターゲット部位の薬物動態学により検出される。全モノクローナル抗体は、最適ターゲット部位付着に、例えば、一般に約20～72時間を要するが、Fab 及び Fab' フラグメントのような抗体フラグメントは一般に約0～8時間を要し、かつ F(ab')_2 フラグメントは一般に約8～24時間を要する。従って、抱合体レシピエントの正常組織は、付着時間の間、活性薬剤に曝され、望ましくない正常組織毒性に導く。この正常組織の露出の結果、特に高毒性部分は一般にターゲット治療に使用できない。

しかし、プレターゲティング法においては、活性薬剤の薬物動態学がターゲットティング部分の薬物動態学から分離している。ターゲットティング部分はリガンダー-アンチリガンダー対の1員に結合する一方、ターゲット部位に付着する。この付着の後、実質的に全ての非ターゲット抱合体がレシピエントの循環からクリアされ、高毒性活性薬剤はリガンダー-アンチリガンダー対の相補的1員に対する抱合体として投与される。好ましくは、毒素-リガンダーまたは毒素-アンチリガンダーは短い半減期を有し、かつ腎臓を経て排出される。この方法では、毒性活性薬剤はその毒性能力が発揮されることが望まれるターゲット部位に付着するか、またはレシピエントから迅速に除去される。この活性薬剤の生体分布は望ましくない毒性からレシピエントの正常組織の保護を促進する。腎臓排出を強化するために、トリコテセンに関して以下で述べるように分子を検出する生体分布を促進する腎臓排出への包含体化を使用できる。代わりに、活性薬剤のより低い治療効果投与量を用いることができる。

パリトキシン、特に高毒性活性薬剤の典型例、は以下によって特徴付けられる：細胞表面レセプターに結合し、かつ細胞膜に孔を形成することにより細胞外に活性を及ぼす2681ダルトン分子量を有する非タンパク質構造である。パリ

トキシシン構造は知られており、Bignami et al., Cancer Research, 52:5759-5764, 1992に記載されている。

パリトキシシンは以下の機能的特徴を示す。リンパ球、繊維芽細胞、及び正常またはウイルス形質転換上皮細胞の培養に対して細胞障害性である。パリトキシシンは脱分極もし、かつ哺乳類の赤血球を溶解(lyses)する。代謝活性循環細胞に対して選択的に毒性である抗癌剤とは対照的に、 Na^+K^+ -ATPアーゼ結合毒素レセプターを発現する細胞を殺傷するようだ。薬理学的研究はパリトキシシンが細胞中でナトリウム、カリウム及びカルシウム束を非常に混乱させることを示す。この混乱は、ミトコンドリアに対する損傷とプロテアーゼ及びホスホリパーゼ酵素の放出を含む結果のカスケード(分岐)を生じ、かつ細胞膜の超微細構造に対する損傷を引き起こす。

本発明のプレターゲットニング法における使用のため、パリトキシシンはリガンドまたはアンチリガンドに結合(抱合)される。説明のため、パリトキシシン-ビオチン及びパリトキシシン-ストレプトアビジン抱合体を以下及び実施例XVIに記載する。

ビオチン-パリトキシシン抱合体の調製のための1つの一般的な戦略は以下のとおりである。

1) パリトキシシンの末端アミン窒素を保護し、かつ

2) ヨードアセチルまたはブロモアセチルビオチン誘導体のようなビオチン保持アルキル化剤でパリトキシシンのヒドロキシル基をアルキル化する。この戦略は、しかし、パリトキシシンの選択的機能化を行うものではない。即ち、その反応において幾分か関係する特定のパリトキシシンのヒドロキシル基は予め選択されていない。

ヨードアセチル-長鎖(LC)ビオチン(Piere Chemical Companyから入手可能)はDMF及びNaH中でアミン保護されたパリトキシシンと反応させ、ビオチン-パリトキシシン抱合体を形成する。パリトキシシンのビオチン誘導化の程度は、他の事の中でも、ヨードアセチル-LC-ビオチン:パリトキシシンの提供比に依存する。一般に、1から約5ビオチン/パリトキシシンの範囲のビオチン誘導化を用いる。末端パリトキシシンアミン基の脱保護はパリトキシシン-ビオチン抱合体のレシビエン

トへの投与の前に行われる。これらの場合、BOC や TFA等の酸又は塩基開裂性保護基を保護段階で用いることが好ましい。in vivo 脱保護を行う場合、酵素開裂（開裂可能リンケージ（架橋）に関して以下に記載するような）が可能な官能基が好ましい。代わりのヨードアセチル-リンカー-ビオチン分子を用いて同様の経路を利用できる。

代わりに、リガンドまたはアンチリガンドはパリトキシシンに選択的に結合できる。即ち、この結合はパリトキシシン分子のユニークな機能性を利用して形成できる。例えば、COOH部分はペプチダーゼで保護アミンパリトキシシン誘導体を処理することにより遊離できる。次いで活性エステルがその遊離COOHを用いて形成され、かつ形成された活性エステルは誘導化されたビオチンアミノ基と反応する。さらに別の可能性はパリトキシシン構造のC-55位置（ユニークアセタール機能性）での誘導化である。遊離のパリトキシシンアミンの保護の後に、環構造中の潜在的なケトンにNaCNBH₃の存在下でビオチンアミンを用いて誘導化できる。還元的アミノ化の生成物は以下のように表される。

ビオチン-リンカー-NH-CH₂-パリトキシシン

但し、炭素原子はパリトキシシン構造のC-55であり、リンカーは少なくとも1つのアミン基を有するホモ-またはヘテロ二官能性リンカーの非アミン部分である。

本発明の実施に有用な他の一般的パリトキシシン-ビオチン抱合体はパリトキシシン分子の末端アミンを介して結合する。例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド-ビオチンのような活性エステルビオチン誘導体、または開裂性リンカーをpH7.5で遊離の非保護末端アミン基を有するパリトキシシンと結合できる。

本発明の実施に有用な好ましい開裂性リンカーは、ターゲット部位にパリトキシシン-ビオチン抱合体が付着するに必要な時間より大きい生理的半減期により特徴付けられる。好ましくは、このリンカーの生理的安定性半減期はビオチン化パリトキシシン抱合体の血清クリアランスの約2～5倍である。この方法において、streptavidinはターゲット部位にプレターゲットされ、かつレシピエントの循環から実質的に除去される。ビオチン-開裂性リンカー-パリトキシシンは投与され、かつプレターゲットされたstreptavidinに局在化される。パリトキシ

ンは抱合体から放出され、ターゲット部位レセプターに結合する。結果として、

ターゲット部位にデリバリーされたパリトキシンは、天然のより高い毒性のアミンフリーの形態である。本発明の実施に有用な開裂性リンカーの例は、ヒドラジドチオウレアリンカー（ NH_2 -誘導化パリトキシニンイソチオシアナート及びビオチンヒドラジドの反応により形成される）；ビオチニダーゼの作用を受けやすい長鎖アミドリリンカー（例えば、遊離アミンを有するパリトキシニンと長鎖-ビオチン-NHS エステル、Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri から入手可能、とから形成される）；エステラーゼの作用を受けやすいエステルリンカー（例えば、遊離アミンを有するパリトキシニンと活性エステル〔ビオチンと $\text{HO-CO-(CH}_2)_n\text{-Br}$ (但し、 n は 2～5 である)との反応生成物である〕とから形成される）等である。

パリトキシニン-ストレプトアビジン抱合体は、例えば、本発明の 2 段階プレターゲットティングプロトコルに使用できる。即ち、ビオチン化ターゲットティング部分を投与し、かつターゲットに局在化させることができる。必要により、循環ビオチン-ターゲット部位抱合体はクリアリング剤（例えば、ガラクトシレート化-アビジン等）を用いるか、その他のクリアランス機構によりクリアされる。次に、パリトキシニン-ストレプトアビジン抱合体は投与され、プレターゲットされたビオチン-含有抱合体に結合する。この抱合体のストレプトアビジン成分は、パリトキシニンの遊離アミン基に結合することにより、またはパリトキシニン構造に関するストレプトアビジンの折りたたみにより、パリトキシニンの全体毒性を減少させる。パリトキシニン-ストレプトアビジン抱合体化は、例えば、上記 COOH- 遊離パリトキシニン誘導体を用いて行うことができる。

代わりに、Bignami et al., Cancer Research, 52:5759-5764 に記載され、ペニシリン G アミダーゼ (PGA) で活性化された N-(4'-ヒドロキシフェニルアセチル)-パリトキシニンのようなパリトキシニンのプロドラッグ（即ち、不活性）体も本発明の 2 段階又は 3 段階プレターゲットティングプロトコルに使用できる。

本発明の 2 段階プレターゲットティングの実施態様は、

ターゲット部分、リガンド-アンチリガンド結合対の 1 員及びプロドラッグを

活性化できる酵素を含む第1の包合体をレシピエントに投与し（但し、第1の包合体はターゲット部位に局在化する）、

任意に、このレシピエントに循環する抱合体のレシピエントからのクリアランスに向けられるクリアリング剤を投与するか、またはこのレシピエントをクリアリング装置若しくは代替のクリアリング手順で処置してレシピエントから循環する抱合体を実質的に除去し、かつ

このレシピエントに、プロドラッグとリガンド-アンチリガンド結合対の1員とを含む第2の包合体に投与する（但し、この第2の包合体の結合対の一員は第1の包合体のそれと相補的であり、かつ第2の包合体は好ましくは腎臓経路を経てレシピエントから迅速にクリアされる）ことを含む。

例えば、L6のような非インターナライジング抗癌腫IgG₂。抗体はストレプトアビジンやPGAと本発明に記載の技術や常法により抱合体化することができる。このPGA-L6-ストレプトアビジン抱合体は投与され、かつターゲット部位に局在化される。好ましくは、循環するPGA-L6-ストレプトアビジンのクリアランスを促進するために、ガラクトース-HSA-ビオチンのようなクリアリング剤を遅い時点で投与する。数時間後に、N-(4'-ヒドロキシフェニルアセチル)-パリトキシニン-ビオチン抱合体を投与し、プレターゲットされたPGA-L6-ストレプトアビジンに付着させるか、またはレセプターのそのための内因性機構によりレシピエントの循環から除去される。

代替的2段階プロトコルにおいて、リガンド/アンチリガンド相互作用は酵素と酵素阻害剤が関係する。そのような2段階プレターゲットインプロトコルは、

ターゲット部分、リガンド-アンチリガンド結合対の1員及びプロドラッグを活性化できる酵素を含む第1の包合体をレシピエントに投与し（但し、第1の包合体はターゲット部位に局在化する）、

任意に、このレシピエントに循環する抱合体のレシピエントからのクリアランスに向けられる酵素を含むクリアリング剤を投与するか、またはこのレシピエントをクリアリング装置若しくは代替のクリアリング手順で処置してレシピエントから循環する抱合体を実質的に除去し、かつ

このレシピエントに、プロドラッグを投与する（但し、このプロドラッグは、プレターゲットされた酵素の部位で活性な細胞障害性形態に変換される）ことを含む。

例えば、L6-PGA抱合体は投与され、ターゲット部位に局在化される。好ましくは、ガラクトース-HSA-PGA不可逆阻害剤のようなクリアリング剤または可逆若しくは不可逆PGA 阻害剤と大型非血管外浸透分子とを含む抱合体を循環PGA-L6- ストレプトアビジンのクリアランスを促進するために遅い時点で投与する。

大型非血管外浸透分子の例は、デキストランである。本明細書の他の箇所で論述している、その他のポリマー類、高分子粒子またはリポソームも使用できる。

本発明の実施に有用な不可逆阻害剤の例は、基質に似た分子中にヨードアセチル基またはアミド基のような反応性基を組み込むことによって設計できる。例えば、ヨードアセタミドはその活性部位にシステイン残基を有する多くの酵素の不可逆阻害剤である。PGA の可逆阻害剤の例は他のアミド基質、例えば、トリグリシンまたは4-ヒドロキシフェニルアセチルグリシン等のようなペプチド類である。

数時間後に、活性薬剤のプロドラッグ体が投与される。例えば、N-(4'-ヒドロキシフェニルアセチル)-パリトキシニン- ビオチンを投与し、この分子は、プレターゲットされたPGA-L6に付着させるか、またはレセプターのそのための内因性機構によりレシピエントの循環から除去される。

上記任意のクリアランス段階の1つの代替法は、単に、レシピエントの本来のクリアランス機構を働かせるに十分な時間放置して循環する第1の抱合体を実質的に除去することである。

3段階法は

ターゲット部分、酵素及びリガンドを含む第1の抱合体をレシピエントに投与し（但し、この第1の抱合体はターゲット部位に局在化する）、

このレシピエントに、アンチリガンドまたはアンチリガンド含有抱合体を投与し、かつ

このレシピエントにプロドラッグを投与する（但し、このプロドラッグはプレ

ターゲットされた酵素の部位で活性な細胞障害性形態に変換される)。

上記方法はN-(4'-ヒドロキシフェニルアセチル)-パリトキシシン/PGA プロドラッグ/酵素対に関して記載してきたが、その外の同様の対に対してもこれらの方法は修正可能である。本発明の実施に有用なプロドラッグ/酵素対の例は、薬剤

のホスフェート体(例えば、フェノールマスタードホスフェート、エトポシド(e toposide)ホスフェート、マイトマイシンホスフェート、ドキソルビシンホスフェート等)及びアルカリホスファターゼ酵素である。例えば、Wallace et al., Bioconj. Chem., 2:349-352, 1991 参照。5-フルオロシトシン(5FC)/シトシンデアミナーゼ(CDase)の別の例は、Senter et al., Bioconj. Chem., 2:447-451, 1991 に記載されている。追加の例は、 β -ラクタマーゼによる β -ラクタムプロドラッグの活性化に関する。

本発明に適宜使用し得る好ましい薬物は、慣用の化学療法剤、例えば、ビンブラスチン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、6-チオグアニン、シタラビン、シクロホスファミド、及びシスプラチナムのような化学療法剤、並びに、Cancer: Principles and Practice of Oncology, 2d ed., V.T. DeVita, Jr., S. Hellman, S.A. Rosenberg, J.B. Lippincott Co., Philadelphia, PA, 1985, Chapter14 に記載されたような他の慣用の化学療法剤である。本発明の範囲内の特に好ましい薬物はトリコテセン(trichothecene)である。

トリコテセンは、不完全菌類種(Fungi imperfecti)の土壌菌類によって産生されるかまたはBaccharus megapotaicaから単離された薬物である(Bamburg, J.R. Proc. Molec. Subcell. Biol. 8:41-110, 1983; Jarvis & Mazzola, Acc. Chem. Res. 15:338-395, 1982)。これらは炭素と水素と酸素とだけを含む最も毒性の分子であると考えられる(Tamm, C. Fortschr. Chem. Org. Naturst. 31:61-117, 1974)。これらはすべて、タンパク質合成を開始、延長及び終結期に阻害する物質としてリボソームのレベルで作用すると報告されている。

トリコテセンは2つの大きなクラス、即ち中心セスキテルペノイド構造だけを

有するものと付加的な巨大環を有するものとに分類できる（それぞれ単純トリコテセン及び巨大環状トリコテセンと呼ぶ）。単純トリコテセンは、米国特許第4,744,981号及び第4,906,452号（引用によって本明細書に含まれるものとする）に記載されているように3つのグループ（即ち、グループA、B及びC）に細分される。グループAの単純トリコテセンの代表例としては、シルペン(Scirpen)、ロリジンC、ジヒドロトリコテセン、シルペン-4,8-ジオール、ベルカロール、シルペントリオール、T-2テトラオール、ペンタヒドロキシシルペン、4-デアセチルネオソラニオール、トリコデルミン、デアセチルカロネクトリン、カロネクトリン、ジアセチルベルカロール、4-モノアセトキシシルペノール、4,15-ジアセトキシシルペノール、7-ヒドロキシジアセトキシシルペノール、8-ヒドロキシジアセトキシシルペノール（ネオソラニオール）、7,8-ジヒドロキシジアセトキシシルペノール、7-ヒドロキシ-8-アセチルジアセトキシシルペノール、8-アセチルネオソラニオール、NT-1、NT-2、HT-2、T-2及びアセチルT-2毒

素がある。グループBの単純トリコテセンの代表例としては、トリコテコロン、トリコテシン、デオキシニバレノール、3-アセチルデオキシニバレノール、5-アセチルデオキシニバレノール、3,15-ジアセチルデオキシニバレノール、ニバレノール、4-アセチルニバレノール（フサレノン-X）、4,15-ジアセチルニバレノール、4,7,15-トリアセチルニバレノール及びテトラ-アセチルニバレノールがある。グループCの単純トリコテセンの代表例としては、クロトコール及びクロトシンがある。巨大環状トリコテセンの代表例としては、ベルカリンA、ベルカリンB、ベルカリンJ（サトラトキシシンC）、ロリジンA、ロリジンD、ロリジンE（サトラトキシシンD）、ロリジンH、サトラトキシシンF、サトラトキシシンG、サトラトキシシンH、ベルチスポリン、ミトキシシンA、ミトキシシンC、ミトキシシンB、ミロトキシシンA、ミロトキシシンB、ミロトキシシンC、ミロトキシシンD、ロリトキシシンA、ロリトキシシンB及びロリトキシシンDがある。さらに、一般的な「トリコテセン」セスキテルペノイド環構造は、高等植物*Baccharis megapotamica*から単離された「バックカリン」と呼ばれる化合物中にも存在する。これらは文献に記載されており、例えばJarvis et al.によって開示されている(Chemistry of A

lleopathy, ACS Symposium Series No.268:ed.A.C. Thompson, 1984, pp.149-159)。

本発明は、毒素を含む活性薬剤の効果的デリバリーを提供する。ターゲッティング部分（一般に遅い）と毒素（静脈投与された場合一般に速く、長命の代謝産物を伴って約5分以下の半減期である）の薬物動態学の分離及びリガンド－アンチリガンド対の高親和性相互作用の組み合わせがこの改良に関係する。毒素活性薬剤が、それ自身は一般に迅速にクリアーされない場合（典型的には肝臓経路を介して）、そのような活性薬剤を含有する抱合体は、比較的速い、好ましくは腎臓クリアランスを付与するように構成される。リガンドまたはアンチリガンドを有する毒素の誘導体化は、毒素活性薬剤の生体分布を向け直すには不十分であろう。代わりに、活性薬剤は低い治療効果的投与量で投与される。この場合、毒素活性薬剤のレシピエントの非ターゲット組織は毒素活性薬剤に対して長期間曝されることがない。

シュウドモナス菌体外毒素(PE)やトリコテセンのような毒素分子は、肝臓中で代謝される。その結果、肝臓毒性はPEの投与に関係する。また、IL-2やTNFのような抗腫瘍薬剤の投与は肝臓毒性を生じることが示されている。そのような生体分布パターンのよって特徴付けられる活性薬剤は、2つの方法で、本発明の2段階または3段階プレターゲティングプロトコルに適応させることができる。

活性薬剤－リガンドまたは活性薬剤－アンチリガンドの低投与量を与える。相補的アンチリガンドに対するリガンドの高親和性のため、ターゲット部位へのターゲッティング部分の付着の間の活性薬剤－ターゲッティング部分結合の必要性なしに、治療効果的投与量が腫瘍にデリバリーされる。活性薬剤－リガンドまたは活性薬剤－アンチリガンドは、一般にレシピエントの肝臓で処理される。レシピエントに対する活性薬剤の投与量が低いこと及びレシピエント内での活性薬剤の循環時間が減少すること（活性薬剤循環半減期は一般にターゲッティング部分の最大ターゲット部位付着時間より短い）により、治療効果的投与量は、非ターゲット部位にデリバリーされる毒性レベルが収拾不可能になることなく、ターゲット部位にデリバリーされる。そのレシピエント（患者）の状況及び治療経過に

照らして投与量を選択する医者の付添いのもとで、ナノグラムからマイクログラムの範囲の活性薬剤の投与量がこの方法では投与される。

代わりに、活性薬剤は本発明の生体分布が腎臓に向けられるのに十分な大きさの高分子分子とカップリングさせることもできる。適当な高分子分子は好ましくは約5000～約50,000ダルトンの範囲の分子量を有する。約5000ダルトン未満のポリマーは、大型の活性薬剤の生体分布に向けられない。50,000ダルトンを超えるポリマーは肝臓で代謝されやすい。本発明のこの態様に有用なポリマーの例は、デキストラン、ポリリシン、ポリグリタメート、特定の大きさ（例えば、約5～約50 kD）のオリゴサッカライド等を含む。例えば、デキストランをリガンドまたはアンチリガンドとカップリングさせる方法は以下の実施例に記載されている。

活性薬剤-ポリマー-リガンドまたはアンチリガンド抱合体は高い活性薬剤投与量で投与できる。何故なら、そのような抱合体は迅速な腎臓クリアランスを示すからである。その結果、レシピエントの非ターゲット組織は、活性薬剤がターゲット部位に結合するか、または腎臓排出により処理されるまでのほんの短い間

だけ活性薬剤に曝される。その結果、約マイクログラムから約ミリグラム(10^{-6} ～ 10^{-3} M)の範囲の活性薬剤の投与量を本方法では投与できる。

実験的薬剤、例えばメルカプトプリン、N-メチルホルムアミド、2-アミノ-1,3,4-チアジアゾール、メルファラン、ヘキサメチルメラミン、硝酸ガリウム、3%チミジン、ジクロロメトトレキセート、ミトグアゾン、スラミン、ブロモデオキシウリジン、ヨードデオキシウリジン、セムスチン、1-(2-クロロエチル)-3-(2,6-ジオキソ-3-ピペリジル)-1-ニトロソウレア、N,N'-ヘキサメチレン-ビス-アセタミド、アザシチジン、ジブロモダルシトール、エルウィニアアスパラギナーゼ、イホスファミド、2-メルカプトエタンスルホネート、テニポシド、タキソール、3-デアザウリジン、可溶性ペーカーアンチフォル、ホモハリントニン、シクロシチジン、アシピシン、ICRF-187、スピロムスチン、レバミソール、クロロゾトシン、アジリジニルベンゾキノン、スピロゲルマニウム、アクラルピシン、ペントスタチン、PALA、カルボプラチン、アムサクリン、カラセミド、イプロプラチ

ン、ミソナダゾール、ジヒドロ-5-アザシチジン、4'-デオキシ-ドキソルビシン、メノガリル、リン酸トリシリピン、ファザラビン、チアゾフリン、テロキシロン、エチオホス、N-(2-ヒドロキシエチル)-2-ニトロ-1H-イミダゾール-1-アセタミド、ミトキサントロン、アコダゾール、アモナフィド、リン酸フルダラビン、ピベンジモール、ジデムニンB、メルパロン、ジヒドロレンペロン、フラボン-8-酢酸、オキサントラゾール、イボメアノール、トリメトレキセート、デオキシスベルグアリン、エチノマイシン及びジデオキシシチジン等も好ましい(NCI *Investigational Drugs, Pharmaceutical Data 1987*, NIH Publication No.88-2141, Revised November 1987 参照)。

本発明に有用な放射性核種としては、ガンマ-エミッタ、ポジトロン-エミッタ、オージェ電子-エミッタ、X-線エミッタ及び蛍光-エミッタがあり、治療用にはベータ-エミッタ及びアルファ-エミッタが好ましい。放射性核種は当業界で公知であり、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{130}I 、 ^{131}I 、 ^{133}I 、 ^{135}I 、 ^{47}Sc 、 ^{72}As 、 ^{72}Se 、 ^{90}Y 、 ^{88}Y 、 ^{97}Ru 、 ^{100}Pd 、 $^{101\text{m}}\text{Rh}$ 、 ^{119}Sb 、 ^{128}Ba 、 ^{197}Hg 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{153}Sm 、 ^{169}Eu 、 ^{212}Pb 、 ^{109}Pd 、 ^{111}In 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{67}Cu 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{166}Ho 及び ^{18}F がある。好ましい治療

用放射性核種としては ^{188}Re 、 ^{186}Re 、 ^{203}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{109}Pd 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{77}Br 、 ^{211}At 、 ^{97}Ru 、 ^{105}Rh 、 ^{198}Au 、 ^{166}Ho 及び ^{199}Ag または ^{177}Lu がある。

他の抗腫瘍剤、例えば細胞増殖の抑制活性をもつ薬剤も本発明に従って投与し得る。抗腫瘍剤の例としては、インターロイキン類(例えば、IL-2、IL-4、IL-6、IL-12等)、形質転換成長因子 β 、リンホトキシン、腫瘍壊死因子、インターフェロン類(例えば、GM-CSF、M-CSF等)、血管浸透性因子のようなシトキン類及びその他の部分、L-セレクチン、E-セレクチン、P-セレクチンのようなレクチン炎症応答促進剤(セレクチン類)、C1q及びNKのようなタンパク質性部分並びに同様の分子がある。

また、適当な抗腫瘍剤は、血管形成誘導を阻害し、その結果、腫瘍細胞の転移を阻害する化合物を含む。そのような部分の例は、プロタミン及び血小板因子4

(米国特許第5,284,827号に記載)を含む。これらの化合物は糖尿病性網膜症、水晶体後部線維増殖症、神経血管緑内障、乾癬、線維血管腫、免疫者及び非免疫者炎症、毛細血管腫、カポジ肉腫のような血管形成誘導(angiotropic)機能不全に関係する疾患の治療にも有用である。

本発明で使用する適当なリガンドとしては、ビオチン、ハプテン類、レクチン類、エピトープ、dsDNAフラグメント、酵素阻害物質及びその類似体及び誘導体がある。有用な相補的アンチリガンドとしては、アビジン(対ビオチン)、糖質(対レクチン類)、及び抗体及びそのフラグメントまたは模倣体を含むその類似体(対ハプテン類及びエピトープ)、ジンクフィンガータンパク質(対dsDNAフラグメント)並びに酵素(対酵素阻害物質)がある。リガンドとアンチリガンドとは少なくとも約 $k_D \geq 10^9 M$ の親和性で互いに結合するのが好ましい。

好ましい2段階プレターゲットティングプロトコルで投与される1つの成分は、ターゲットティング部分-アンチリガンドまたはターゲットティング部分-リガンドの抱合体である。3段階プレターゲットティングで投与される好ましい成分はターゲットティング部分-リガンド抱合体である。本発明のこれらの実施態様で有用な好ましいターゲットティング部分はモノクローナル抗体である。しかしながら、タンパク質-タンパク質結合は、高分子量の架橋種のような望ましくない副生物の形成に起因す

る問題を含む。ビオチン化抗体とストレプトアビジンとの反応を含む非共有結合的合成方法はかなりの副生物を形成することが報告されている。また、ストレプトアビジンの4つのビオチン結合部位の少なくとも1つは抗体とストレプトアビジンとの結合に使用されるが、残りの結合部位はストレプトアビジン-抗体抱合体の立体配置によって立体的に妨害されるのでビオチン結合のために使用することはできない。

従って、抗体-ストレプトアビジンの共有結合により抱合することが好ましいが、高分子量の副生物がしばしば生成される。架橋及び凝塊形成の程度は、ヘテロ二官能架橋試薬を用いるタンパク質誘導化レベルなどの複数の要因に左右される。Sheldon et al., *Appl. Radiat. Isot.* 43:1399-1402, 1992は、共有結合したチオエーテル抱合体を、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘ

キサン-1-カルボキシレート (SMCC) 誘導化抗体とイミノチオラン誘導化ストレプトアビジンとの反応によって製造する方法を記載している。

ストレプトアビジン-タンパク質ターゲティング部分抱合体は、好ましくは実施例XIに後述するように調製され、この調製は、SMCC誘導化ストレプトアビジンの調製と、DTT還元タンパク質ターゲティング部分の調製と、このように調製された2つの部分の抱合と、架橋(抗体-ストレプトアビジン-抗体)及び凝集した種からのモノ置換及び/またはジ置換(ストレプトアビジン置換)抱合体の精製とからなる段階を含む。好ましくは精製した分画を、HPLCサイズ排除、SDS-PAGE、免疫反応性、ビオチン結合能力及び *in vivo* 検査等のいずれか1つ以上を用いてさらに特性決定する。

または、本発明の実施に有用なチオエーテル抱合体は、SPDP、イミノチオラン、SATAのような他のチオール化剤または *m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエートのような他のチオ反応性ヘテロ二官能架橋剤を用いて形成され得る。

本発明のストレプトアビジン-タンパク質ターゲティング部分抱合体はまた、1つのタンパク質のリシンイプシロンアミノ基と他のタンパク質のマレイミド誘導化形との抱合によって形成され得る。例えば、リシンイプシロンアミノ基は、例えばタンパク質をSMCCによって処理することによって調製されたタンパク質マ

レイミドとpH8~10で反応し、共有結合した安定なアミン共有結合抱合体を生成する。また、1つのタンパク質のリシンイプシロンアミノ基と他のタンパク質のアルデヒド官能基との反応によって抱合体を調製してもよい。得られたイミン結合を還元して対応する安定なアミン結合を生成し得る。アルデヒド官能基は、例えばタンパク質糖残基の酸化またはアルデヒド含有ヘテロ二官能架橋剤との反応によって得られる。

ストレプトアビジン-ターゲティング部分抱合体の別の形成方法では、固定化イミノビオチンをSMCC誘導化ストレプトアビジンと結合させる。この抱合/精製方法では、ストレプトアビジンに対する(固定化)イミノビオチンの結合が可逆性であることを利用して、未反応のターゲティング部分から抱合体を容易に分離し

得る。低pH及び高イオン強度の条件下、例えばNH₂OAc, pH4 (50mM) と0.5MのNaClとの存在下でイミノビオチン結合を逆転させ得る。

例えば、ストレプトアビジンの場合、以下の手順で抱合/精製を行う。

ーストレプトアビジンのSMCC誘導体を好ましくはカラム形態の固定化イミノビオチン(Pierce Chemical Co., St. Louis, Missouri)に結合させる、

ー(ストレプトアビジンに対して)モル過剰量のDTT還元抗体(好ましくは還元剤非含有)を、窒素パージシリン酸塩緩衝したSMCC-ストレプトアビジン結合イミノビオチンカラムに添加する(DTT還元抗体は結合したSMCC-ストレプトアビジンを飽和させ、カラムを通過した未結合の還元抗体は再使用できる)、

ーカラムを洗浄して余剰の抗体を除去する、

ーpHを低下させイオン強度を増加させるバッファーをカラムに添加して、ストレプトアビジン-抗体抱合体を純粋な形態で溶出させる。

上述のように、ターゲティング部分が介在するリガンド-アンチリガンドプレターゲティングでは、ターゲティング基-リガンドまたはターゲティング基-アンチリガンドを標的組織に局在させる。血行中のターゲティング部分含有抱合体のレベルが十分に低い値になり最適なターゲット対非ターゲット抱合体比が達成される前に、ターゲット組織への取込みがピークに達することがしばしば生じる。この問題を解決するためには、2つの方法が有効である。第1の方法では、ターゲティング部分含有抱合体を「天然の」即ち内因性クリアランスメカニズムに

よって血液からクリアする。この方法は、タンパク質の全身性クリアランスの多様性及び内因性リガンドまたはアンチリガンドによって複雑化する。例えば、内因性ビオチンが、ストレプトアビジン-ターゲティング部分抱合体上のビオチン結合部位の保存を妨害し得る。

ターゲティング部分-リガンドまたはターゲティング部分-アンチリガンドの抱合体ターゲット対血液比を改善する第2の方法では、相補的アンチリガンドまたはリガンドを構成または含有する分子と抱合体とのin vivo複合体形成を介して抱合体を血行から「追放する」。例えば、ビオチン化抗体をリガンド-ターゲティング部分抱合体として使用する場合、アビジンは循環中のビオチン化抗

体との複合体形成によって比較的大きい凝集種を形成し、この凝集種がRES取込みによって血液から速やかにクリアされる。例えば、米国特許第4,863,713号を参照されたい。しかしながら、この方法に関する1つの問題は、腫瘍に結合したビオチン化抗体がアビジンによって架橋されインターナリゼーションを受ける可能性があることである。

アビジン-ターゲッティング部分抱合体を使用する場合、RES取込みによってクリアされる比較的大きい凝集種を形成するためにポリビオチン化トランスフェリンが使用される。例えば、Goodwin, J. Nucl. Med. 33(10):1816-18, 1992参照。しかしながら、ポリビオチン化トランスフェリンもまた、腫瘍に結合したアビジン化ターゲッティング部分を架橋させインターナリゼーションする能力を有している。さらに、両方の「追放」方法においても、(中程度の粒子は大粒子のようにRES取込みによって速やかにクリアされず)大きい凝集種よりも中間の大きさの凝集種の存在時間が延長し、後で投与されるリガンド-活性薬剤またはアンチリガンド-活性薬剤の血清滞留が生じる。このような血清滞留はターゲット細胞対血液ターゲッティングの比に不利な影響を与える。

本発明は、タンパク質組成及び非タンパク質組成からなるクリアリング剤を提供する。これらは、アンチリガンド/リガンド(例えばアビジン/ビオチン)-ターゲッティング部分(例えば抗体)抱合体のin vivo複合体形成及び血中クリアランスのための使用を容易にするような物理的特性を有している。これらのクリアリング剤は、ターゲッティング部分抱合体のターゲット：血中比を改善するた

めに有用である。これらのクリアリング剤の他の用途は、抗体-活性薬剤デリバリーの方式を用いた病巣例えば凝血塊の造影または治療である。例えば、有効な凝血防止剤は、速やかなターゲット局在化と高いターゲット：非ターゲットのターゲッティング比とを与える。有効なクリアリング剤を用い、本発明のプレターゲッティングプロトコルで投与される活性薬剤は、望ましい形態でターゲット化され、従って、肺塞栓症及び深在性静脈血栓症のような症状の造影/治療に有用である。

本発明の実施に有用なクリアリング剤は好ましくは、

－ターゲッティング部分-リガンド(またはアンチリガンド)抱合体との複合体の迅速で有効な *in vivo* 形成、

－後で投与される相補的アンチリガンドまたはリガンド含有分子と結合し得るターゲッティング部分抱合体の速やかな血中クリアランス、

－大量のターゲッティング部分抱合体のクリアリング(または不活性化)の高い能力、

－低い免疫原性、

の特徴のいずれか1つまたはそれ以上を有している。

好ましいクリアリング剤は、ヘキソースを主成分とするもの及びヘキソースを主成分としないものに大別される。ヘキソースを主成分とするクリアリング剤は、アシュウェル(Ashwell)レセプターまたは他のレセプター、例えば内皮細胞及び/または肝臓のクッパー細胞に結合したマンノース/N-アセチルグルコサミンレセプターもしくはマンノース6-ホスフェートレセプターによって認識される1つまたはそれ以上のヘキソース(六炭素糖部分)を含むように誘導化された分子である。このようなヘキソースの例としては、ガラクトース、マンノース、マンノース6-ホスフェート、N-アセチルグルコサミン等がある。グルコース、N-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースのチオグリコシド並びにD-ガラクトシド類及びグルコシド類全般のようなアシュウェルレセプターによって認識される他の部分も本発明の実施に使用され得る。本明細書ではガラクトースが典型的なクリアリング剤のヘキソース誘導体である。ガラクトースチオグリコシドとタンパク質との抱合は、Lee et al., "2-Imino-2-methoxyethyl 1-Thioglycosides: New Reagents for Attaching Sugars to Proteins,

"*Biochemistry*, 15(18):3956, 1976 の教示に従って行うのが好ましい。また別の有用なガラクトースチオグリコシド抱合の方法は、Drantz et al., "Attachment of Thioglycosides to Proteins: Enhancement of Liver Membrane Binding," *Biochemistry*, 15(18):3963, 1976 に記載されている。従って、ガラクトースを主成分とする分子及びガラクトースを主成分としない分子について以下に記載する。

ガラクトースを主成分とするタンパク質型クリアリング剤は、内因性露出ガラクトース残基を有するタンパク質、またはこのようなガラクトース残基を露出させるかもしくは組込むように誘導化されたタンパク質を含む。露出ガラクトース残基はそれについての特異的レセプター（アシュウェルレセプター）が媒介する肝内細胞取り込み作用によってクリアリング剤の迅速なクリアランスを起こす。これらのレセプターはクリアリング剤と結合し、肝細胞内取込み作用を誘発し、リソソームと融合させる。レセプターは細胞表面に戻り再利用される。このクリアランスメカニズムの特徴は、高い効率、高い能力及び速い動力学にある。

タンパク質を主成分とするガラクトース含有クリアリング剤の例は、ヒト α_1 酸性糖タンパク質（オロソムコイド、分子量=41,000ダルトン、等電点=1.8~2.7）のアシアロオロソムコイド誘導体である。アシアロオロソムコイドの迅速な血中クリアランスはGalli et al., J. of Nucl. Med. Allied Sci. 32(2):110-16, 1988に記載されている。

オロソムコイドをノイラミニダーゼで処理するとシアル酸残基が除去され、その結果としてガラクトース残基が露出する。このように誘導化された他のクリアリング剤としては、例えば、ガラクトシル化アルブミン、ガラクトシル化-IgM、ガラクトシル化-IgG、アシアロハプトグロビン、アシアロフェツイン、アシアロセルロプラスミン等がある。

例えばヒト血清アルブミン(HSA)は本発明のクリアリング剤中で、 $(\text{ヘキソース})_m - \text{ヒト血清アルブミン(HSA)} - (\text{リガンド})_n$

(n は1から約10までの範囲の整数、 m は1から約25までの範囲の整数)の形態で使用され、ヘキソースはアシュウェルレセプターによって認識される。本発明の好ましい実施態様では、リガンドがビオチンであり、ヘキソースがガラ

クトースである。より好ましくは、HSAが10~20個のガラクトース残基及び1~5個のビオチン残基によって誘導化される。さらに好ましくは、本発明のHSAクリアリング剤は、約12~約15個のガラクトースと3個のビオチンによって誘導化される。平均で上記整数例えばビオチン1個に対応するビオチン化レベル範囲を各々が有するクリアリング剤分子を得るために十分な方法で、ガラクトース及び

ビオチンの双方によって誘導化が行われる。例えば3個のビオチンによって誘導化すると、実質的に全部の分子の各々が少なくとも1個のビオチン残基を有するクリアリング剤分子からなる混合物が得られる。1個のビオチンによって誘導化すると、各分子の有意な部分がビオチン誘導化されないクリアリング剤混合物が得られる。本明細書で使用する整数は記載したクリアリング剤の平均ビオチン化を示す。

さらに、ヒトタンパク質、特にヒト血清タンパク質、例えばオロソムコイド及びヒト血清アルブミン、ヒトIgG、IgG及びIgMクラスのヒト-抗抗体等を主成分とするクリアリング剤は、ヒトレシビエントの血清に投与されたときに免疫原性が小さい。アシアロオロソムコイドを用いる別の利点は、ヒトオロソムコイドが例えばSigma Chemical Co., St.Louis, Missouriから市販されていることである。

ターゲットに結合した抱合体とクリアリング剤との直接的な複合体形成による好ましくない結果を防止するために、血管外隙に拡散し難くまたターゲットに結合した抱合体に結合し難い十分な大きさのクリアリング剤を使用する。この戦略は単独でも有効であり、また上述のように露出ガラクトース残基が迅速な肝取込みを起こすという認識と組合わせても有効である。このサイズ排除戦略は、ガラクトースを主成分としない本発明のクリアリング剤の効果を高める。組合わせ（露出ガラクトースとサイズ）戦略は、「タンパク質型」または「ポリマー型」のガラクトースを主成分とするクリアリング剤の効果を高める。

ガラクトースを主成分とするクリアリング剤としては、中間的な分子量(約40,000から約200,000ダルトン)を有するガラクトシル化ビオチン化タンパク質(例えば循環中のストレプトアビジン-ターゲティング部分抱合体を除去する)があり、その例は、ビオチン化アシアロオロソムコイド、ガラクトシル-ビオチ

ニル-ヒト血清アルブミンまたは他の免疫原性でない可溶性天然タンパク質のガラクトシル化ビオチン化誘導体、並びにビオチン-及びガラクトース-誘導化ポリグルタメート、ポリリシン、ポリアルギニン、ポリアスパルテート等である。ガラクトシル-ビオチニル-IgMまたは-IgG(約150,000ダルトン)、並びにヒト血清アルブミン、IgG及びIgM分子等とガラクトース-及びビオチン-誘導化トランスフェ

リンとの抱合体のようなターゲットに接近し難い特徴を有する高分子量の部分(約200,000から約1,000,000ダルトン)も本発明のクリアリング剤として使用し得る。中間的な分子量または高分子量(約40,000から約1,000,000ダルトンの範囲)の化学的に改変したポリマー、例えばデキストラン、ヒドロキシプロピルメタクリルアミドポリマー、ポリビニルピロリドン-ポリスチレンコポリマー、ジビニルエーテル-マレイン酸コポリマー、ピランコポリマーまたはPEG等のガラクトース-及びビオチン-誘導体も本発明の実施においてクリアリング剤として有用である。さらに、速やかに除去されるビオチン化リポソーム(ターゲットに接近し難い高分子量部分をもつ)をガラクトース及びビオチンによって誘導化することによって本発明の実施に使用されるクリアリング剤を調製してもよい。

本発明に使用し得る別のクラスのクリアリング剤は、*in vivo*分布量として血管腔に閉込められる十分な極性を示す低分子(約500から約10,000ダルトンの範囲)のガラクトース及びビオチンの誘導体である。より具体的には、この物質は高荷電構造を示し、その結果、血管内面の脂質膜を透過して拡散し難いので血管外隙に分布し難い。このようなクリアリング剤の例は、6,6'-[(3,3'-ジメチル[1,1'-ビフェニル]-4,4'-ジイル)ビス(アゾ)ビス[4-アミノ-5-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸]四ナトリウム塩のモノ-またはポリ-ビオチン-誘導体、ポリ硫酸化デキストラン-ビオチンのモノ-またはポリ-ビオチニル-ガラクトース-誘導体、あるいはデキストラン-ビオチンのモノ-またはポリ-ビオチニル-ガラクトース-誘導体等である。

ガラクトース露出またはガラクトース誘導化クリアリング剤は、(1)リガンド-アンチリガンド親和性を介して対応するリガンド-またはアンチリガンド-含有抱合体との複合体を迅速かつ有効に形成でき、(2)形成された複合体が、肺及

び脾臓等の普遍的なRES系に取込まれる凝集複合体とならずに、肝特異的分解系であるガラクトースレセプターを介して血液からクリアされるのが好ましい。さらに、ガラクトースに媒介される肝取込みの迅速な動力学と、リガンド-アンチリガンド相互作用の親和性との共存によって、中間的な分子量の担体の使用が可能であり、低分子量の担体の使用さえ可能である。

血液中に局在する(約40,000から約200,000ダルトンの範囲の)低分子量または中間的分子量のガラクトース残基非含有部分は血管外隙と平衡し、従ってターゲットに結合した抱合体と直接的に結合して、ターゲットの局在化を低下させる。さらに、RES系を介した凝集に依存するクリアランスメカニズムは大幅な化学量論過剰量のクリアリング剤を必要とする。これに対し、本発明で使用されるガラクトースを主成分とするクリアリング剤の場合には、血中クリアランスが速いので平衡を防止でき、またリガンド-アンチリガンドが高親和性で結合するので少量の化学量論量のそのようなガラクトースを主成分とするクリアリング剤を使用するだけでよい。このようにクリアリング剤の絶対投与量を減らすことができるので、この特徴により、ガラクトースを主成分とするクリアリング剤がターゲットに結合した抱合体に悪影響を及ぼす可能性も低下される。

本発明のガラクトース-またはビオチン-誘導化クリアリング剤を使用したクリアリング剤評価実験に関しては実施例XIII及びXVIで詳述する。実施例XVIの実験で試験した特定の本発明のクリアリング剤は、(1)アシアロオロソムコイド-ビオチン、(2)ヒト血清アルブミンのガラクトース及びビオチン誘導体、並びに、(3)分子量70,000ダルトンのデキストランのビオチン及びガラクトース誘導体である。実験により、ガラクトース及びビオチンの双方を含有するようなタンパク質及びポリマーの誘導体を合成することができ、得られた誘導体分子は循環中のストレプトアビジン-タンパク質抱合体をレシピエントの血清から有効に除去し得ることを示した。循環アビジン含有抱合体の血液プールのクリアと、ストレプトアビジン含有抱合体によって認識されたターゲット部位に後で投与されたビオチン化同位元素をデリバリーする能力とに対する効果を判定するために、ビオチン添加量を種々に変更した。投与成分の相対用量がクリアリング剤の効果に与える効果も試験した。

ガラクトースを主成分としないタンパク質型及びポリマー型のクリアリング剤は、ガラクトース露出、ガラクトース誘導化等を有しない上述の物質である。これらのクリアリング剤は、凝集媒介RESメカニズムによって作用する。本発明のこれらの実施態様において使用されるクリアリング剤は、クリアリング剤の接近

を排除すべきターゲット器官に基づいて選択される。例えば腫瘍ターゲットまたは凝血塊ターゲットが存在するときは、(約200,000ダルトンから約1,000,000ダルトンの範囲の)高分子量クリアリング剤を使用する。

別のクラスのクリアリング剤は、循環中のリガンドまたはアンチリガンド/ターゲティング部分抱合体を除去するのではなく、その代わり抱合体上の対応するアンチリガンドまたはリガンドの結合部位をブロックすることによって循環中の抱合体を「不活性化」する物質を含む。これらの「キャップ型」クリアリング剤は、好ましくは小さい(500~10,000ダルトン)高電荷分子であり、血漿区画の容積に等しい分布量(即ち、血管外隙に溢血しない量)を生じる物理的特性を示す。代表的な「キャップ型」クリアリング剤は、6,6'-[(3,3-ジメチル[1,1'-ビフェニル]-4,4'-ジイル)ビス(アゾ)ビス[4-アミノ-5-ヒドロキシ-1,3-ナフタレンジスルホン酸]四ナトリウム塩のポリ-ビオチン-誘導体、ポリ硫酸デキストラン-ビオチンのポリ-ビオチニル-誘導体、デキストラン-ビオチンのモノ-またはポリ-ビオチニル-誘導体等である。

キャップ型クリアリング剤は、対応するアンチリガンドまたはリガンドによって誘導化され、次いで、リガンド/またはアンチリガンド/ターゲティング部分抱合体を予め投与しておいたレシピエントに投与される。従って、クリアリング剤-抱合体の結合により、循環中の抱合体が後で投与される活性薬剤-リガンド抱合体または活性薬剤-アンチリガンド抱合体に結合する能力が低下する。循環中の抱合体の活性薬剤に結合する能力が低下するので、ターゲットに対する活性薬剤のデリバリー効率が増加し、長期間循環する動力学的血清タンパク質と活性薬剤との結合が阻害されることによってターゲットに結合した活性薬剤対血行中の活性薬剤の比が増加する。また、クリアリング剤が血漿区画に閉込められるので、ターゲットに結合したリガンドまたはアンチリガンドに対する悪影響も防止できる。

本発明のクリアリング剤は、一回でまたは分割して投与し得る。例えば、ビオチン化クリアリング剤を一回で投与すると、血行中のターゲティング部分-ストレプトアビジンレベルが急激に低下し、次いで多少上昇する。その理由は、少な

くともその一因として、レシピエントの生理的区画内でターゲティング部分-ストレプトアビジンの平衡が回復するためであると推測される。従ってターゲティング部分-ストレプトアビジンのクリアランスを補うために2次的用量即ち追加用量のクリアリング剤を投与してもよい。あるいは、ターゲティング部分-ストレプトアビジンを連続的にクリアするのに十分な時間にわたってクリアリング剤を静脈内注入してもよい。

本発明の実施においては、循環中のターゲティング部分-リガンドまたは-アンチリガンド抱合体をレシピエントの循環から除去するためには、他の種類のクリアリング剤及びクリアランスシステムも有用である。例えば、実施例IXは微粒子を主成分とするクリアリング剤を記載している。実施例IXはまた、体外クリアランスシステムも記載している。実施例IXには、動脈に挿入されたタンパク質性または高分子性マルチループ装置を使用する in vivo クリアランスプロトコルも記載している。

本発明の実施態様において、I-125、I-123、Er-165、Sb-119、Hg-197、Ru-97、Tl-201及びI-125及びBr-77のようなオージェ電子エミッタまたは核結合薬剤をターゲット細胞核にデリバリーする場合には即効性のクリアリング剤が有効である。本発明のこれらの実施態様では、ターゲット細胞表面のインターナリゼーションレセプターに局在させたターゲティング部分を利用して、ターゲティング部分含有抱合体(即ち、好ましい2段階プロトコルではターゲティング部分-アンチリガンド抱合体)をターゲット細胞集団にデリバリーする。このようなインターナリゼーションレセプターとしては、EGFレセプター、トランスフェリンレセプター、HER2レセプター、IL-2レセプター、他のインターロイキン及びクラスター分化抗原レセプター、ソマトスタチンレセプター、他のペプチド結合レセプター等がある。

抱合体をターゲット細胞に局在させるために十分な時間であるが、レセプター媒介事象(receptor-mediated event)を介した細胞によるターゲットに向けら

れた抱合体のインターナリゼーションが誘発されるためには不十分である時間の経過後、即効性のクリアリング剤を投与する。好ましい2段階プロトコルにおい

ては、循環中のターゲティング部分含有抱合体との複合体を形成する機会がクリアリング剤に与えられた直後に、ビオチン-オージェ電子エミッタまたはビオチン-核作用薬のような活性薬剤含有のリガンドまたはアンチリガンド抱合体を投与する。クリアリング剤投与と活性薬剤投与との時間差は約24時間未満である。このようにして、活性薬剤はターゲット細胞レセプターを介したインターナリゼーションによって容易にインターナリゼーションを受ける。循環中のオージェ電子エミッタは無毒であると考えられているが、本発明のプレターゲティングプロトコルによって実現する特異的ターゲティングは、入手し得る安定に結合できるI-123のような半減期の短いオージェ電子エミッタの効果を増強する。

治療線量または診断線量の放射線をターゲット部位に、より効率的にデリバリーするためには、放射性核種が腫瘍細胞表面に維持されるのが好ましい。腫瘍細胞または肝細胞のような代謝活性型のターゲット細胞の場合には、細胞媒介代謝性分解の結果としてターゲットに向けられた放射線の減損が生じる。

従って本発明に包含される好ましい薬剤及びプロトコルの特徴は、放射性核種を局在させるターゲット細胞部位での放射性核種の滞留時間が延長し、このターゲット部位に蓄積される放射線吸収線量が増加し、ターゲットされた放射能の代謝による減損が少ないことである。本発明のこの特徴の実現に特に有効な放射性核種は、細胞膜を通過し易く従って本質的に細胞によって保持されない化学的形態で存在するレニウム、ヨウ素等の「+3電荷をもたない」放射性金属である。これに対し、+3電荷を有する放射性核種、例えばIn-111、Y-90、Lu-177及びGa-67は高電荷密度のキレートに包囲されている結果として自然なターゲット細胞における滞留を示す。

ストレプトアビジンが代謝性分解に耐性であることは証明されている。従って放射性核種は、例えばターゲティング部分に直接結合するよりもむしろストレプトアビジンに直接または間接に結合したほうがターゲット細胞部位に滞留する時間が長い。ストレプトアビジンに結合した放射性核種を、プレターゲティングプロトコルに従って静脈内、動脈内等に投与してもよくまたは病巣に直接注入してもよい。

Abramsの米国特許第4,867,962号明細書には、活性薬剤-ターゲッティング部分抱合体を用いて活性薬剤をターゲット部位にデリバリーする優れた方法が記載されている。Abramsの方法は、要するにそれぞれ異なる抗体種のターゲッティング部分を有している2つ以上の活性薬剤-ターゲッティング部分抱合体をレシピエントに投与しようとするものである。ここで使用する抗体種はそれぞれ異なるターゲット部位のエピトープ（同一または異なるターゲット部位の抗原に存在する）に対して反応性を示し、抗体種の交差反応性のパターンに重複はない。投与する各抱合体の活性薬剤成分は、同一であっても異なっても構わない。

このようにして、所望のターゲット部位には（抗体に結合している活性薬剤とともに）さまざまな抗体が加算的に集積する。一方、各種の交差反応性非ターゲット組織には、1つの抗体種か、投与した抗体種の総数より少ない抗体種しか集積しない。投与した活性成分は、in vivoでは非ターゲット組織よりもターゲット部位により多く局在化する。診断薬としてこの方法を実施すれば、比較的少量でターゲット部位がより明確に検出またはイメージされる（すなわち、非ターゲット組織の集積バックグラウンドはより拡散している）。種々の非ターゲット組織には治療剤があまり集積しないため、望ましくない非ターゲット毒性を発現させることなく、投与すべき結合活性薬剤の投与量を増やすことができる。

本発明は、以下に記載する2段階または3段階のプレターゲッティング法を提供する。

2段階法は以下の工程を含む：

第1の交差反応性パターンを有する第1の抗体種のターゲッティング部分とリガンド-アンチリガンド結合対の1員を含む第1の抱合体をレシピエントに投与する工程、

1つ以上の別のターゲッティング抱合体をレシピエントに投与する工程（ここで用いる各抱合体は、他の抱合体や第1の抱合体の抗体種とは異なる抗体種のターゲッティング部分と第1の抱合体に結合しているリガンド-アンチリガンド対の1員を有しており、各抗体種の交差反応性パターンは他の抱合体の交差反応性パターンや第1の交差反応性パターンと実質的に重複しない）、

レシピエントから循環する抱合体をクリアすることができるクリアリング剤をレシピエントに投与する任意の工程、あるいは、レシピエントから循環する抱合体を実質的に除去するためのクリアリングデバイスまたはこれに代わるクリアリング工程を用いてレシピエントを処置する任意の工程、および、

活性薬剤と第1の抱合体のリガンド／アンチリガンド結合対の1員に相補的な1員を含む第2の抱合体をレシピエントに投与する工程を含む。

上記任意工程を行う代わりに、循環する抱合体を実質的に除去するのに十分な時間をかけて、レシピエント生来のクリアリングメカニズムを機能させるだけでもよい。

3段階法は以下の工程を含む：

第1の交差反応性パターンを有する第1の抗体種のターゲッティング部分とリガンド含む第1の抱合体をレシピエントに投与する工程、

1つ以上の別のターゲッティング抱合体をレシピエントに投与する工程（ここで用いる各抱合体は、他の抱合体や第1の抱合体の抗体種とは異なる抗体種のターゲッティング部分と第1の抱合体に結合しているリガンドを有し、各抗体種の交差反応性パターンは他の抱合体の交差反応性パターンや第1の交差反応性パターンと実質的に重複しない）、

レシピエントにアンチリガンドを投与する工程、および、

リガンドと活性薬剤を含む第2の抱合体をレシピエントに投与する工程（第1の抱合体が先に局在化しているためターゲット部位への第2の抱合体の局在化が増進されている）

あるいは、抗体または非抗体を主成分とするターゲッティング部分を、非制御抗原を有するターゲット部位にリガンドまたはアンチリガンドをデリバリーするために用いてもよい。このような非制御抗原用の天然結合剤を、かかる目的に使用するのが好ましい。例えば、肝腫瘍や骨髄腫などの疾病は、一般に非制御IL-6レセプターによって特徴づけられる。IL-6は、このレセプターに対してこれらのターゲット細胞型の迅速な増殖についてオートクリンまたはパラクリン部位として作用する。このため、これらの疾病を治療するために、本発明のプレターゲッティングプロトコルのターゲッティング部分としてIL-6を用いてもよい。

例えば、IL-6とストレプトアビジンを化学的手段によって抱合体にしたり、組換え分子にしてもよい。IL-6-ストレプトアビジン抱合体をレシピエントに投与し、抱合体のIL-6成分の働きによって抱合体をIL-6レセプターに局在化させる。この局在化は、非制御IL-6レセプターを有する部位に特異的に起こる。ターゲット部位へ局在化させた後、レシピエント内を循環するIL-6-ストレプトアビジン抱合体を実質的にクリアするために、場合によってはクリアリング剤を投与してもよい。このような目的で使用されるクリアリング剤としては、例えばIL-6レセプター-HSA-ガラクトース、アンチ-IL-6-抗体-HSA-ガラクトースなどが適当である。十分な時間をかけてレシピエント内を循環しているIL-6を実質的にクリアした後、活性薬剤-ビオチン抱合体を投与して、IL-6-ストレプトアビジン抱合体によってターゲット部位に局在化させる。

本発明の上記側面の実施において、各抗体種は各々ターゲット部位に結合している異なるエピトープを認識するため、活性薬剤抱合体レセプターのターゲット部位への集積（すなわち、第1の抗体種および追加のターゲッティング抗体種に抱合しているリガンドまたはアンチリガンド）が改善される。このように異なるエピトープにアプローチするために、活性薬剤抱合体レセプターにとってより有効なターゲット部位結合部が提供されることになる。このため、ターゲット部位が（エピトープの飽和および／または立体障害によって）飽和するのを事実上または効果的に回避してもよいし、ターゲット結合部位の障害（ターゲット部位の表面エピトープの結合によって内部ターゲット部位エピトープの出口を狭くする）を緩和してもよいし、活性薬剤抱合体レセプターをさらに蓄積させてもよい。本発明のこの側面を実施する際は、活性薬剤含有抱合体が結合していてもよいアンチリガンドまたはリガンドが高濃度で存在するターゲット部位に、リガンドーまたはアンチリガンドー活性薬剤抱合体を提供する。立体条件が主として支配するまでは、ターゲット部位の抗原濃度が高いほど、ターゲット部位への活性薬剤量が増加する。

「交差反応性パターンが重複しない」とは、1つの抗体種が結合する非ターゲット組織が、他の抗体種が結合する非ターゲット組織と実質的に異なることを意味する。交差反応性パターンは、診断目的の投与の場合はバックグラウンドを比例

的に減らし、治療目的の投与の場合は正常組織に対する毒性を減らすのに必要な程度異なっていなければならない。本発明のこれらの側面を実施する際は、非ターゲット組織との交差反応性の重複が少ない抗体対（または多種抗体の組み合わせ）ほど有用である。

診断または治療目的の使用のために、交差反応性が互いに重複していない2つ以上のターゲットに特異的なモノクローナル抗体の組み合わせを選択するとき、特定のターゲット部位に対するモノクローナル抗体の交差反応性パターンを分析する。抗体は、さまざまな方法でスクリーンすることができる。ターゲット組織との反応性と非ターゲット組織との交差反応性を決定するために *in vitro* で行う方法は、免疫組織化学的分析法である。抗体種が結合している組織の同定は、組織を抗体にさらし、その組織を洗浄して非結合抗体をすべて除去し、結合抗体の存在を検出することによって行う。この免疫組織化学的分析法には、凍結組織片を用いるのが好ましい。それは、組織固定法を用いた場合はエピトープが破壊されることがあり、抗原保存性を損なうかも知れないタイミングで不定物と結合するからである。固定後も保存できることが分かっている抗原に対しては、組織固定法が効果的な場合もある。*in vitro* 組織化学法は公知である（例えば、Ceriani et al., *Cancer Research*, 47:532-540, 1987, または米国特許第4,867,962号明細書の実施例 I）。

多種のターゲットィング部分を投与する本発明のこれらの側面において、各成分の投与量は診療する医師が自身の経験に基づいて決定するであろう。特にレシピエントの状態や（結合している抗原を含むターゲット部位の性質や場所が、抗体種の選択や投与経路の決定に影響を与える）、使用する抗体種の組み合わせ（抗原濃度や該抗原に対する抗体の親和性によって抗体の作用が変化する）に基づいて決定する。上記成分の有効投与量の決定法は、当業者に明らかである。

本発明は、プレターゲットィング抱合体および／または活性薬剤含有抱合体に潜在する抗原性を低くしたり無くしたりすることによって、上述のプレターゲットィング法をさらに改良することをも目的とする。

この目的は、とくにプレターゲットィング抱合体または活性薬剤含有抱合体に含まれているリガンドまたはアンチリガンド、あるいはプレターゲットィング抱

合体に含まれているターゲッティング部分を改質することによって達成される。この改質は、グリコール部分、好ましくはポリアルキレングリコール部分、さらに好ましくはポリエチレングリコール部分を、1つ以上のアンチリガンドまたはターゲッティング部分に結合することによって行う。

グリコール、とくにポリエチレングリコールをタンパク質などの所望の化合物に結合させる方法は、当業界では周知である。例えば、W094/05332号明細書には、グリコシル化部分、好ましくは炭素数1-20のアルキレングリコールを用いて、グリコール部分をタンパク質や核酸などの巨大分子に結合させる方法が記載されている。この方法は、ポリアルキレングリコールを活性化し、活性化したポリアルキレングリコールをジアミノ化合物と反応させて、ジアミノ化合物のアミノ基の1つを介してポリアルキレングリコールをジアミノ化合物にカップリングし、巨大分子（例えば治療用タンパク質）を酸化して巨大分子中に存在する1つ以上のグリコール基を活性化し、ポリアルキレングリコールをカップリングしたジアミノ化合物を酸化されたグリコシル基と反応させ、グリコシル基を介して巨大分子に結合しているグリコールを有するグリコール化グリコシル化巨大分子を生成するものである。この明細書によれば、この方法によって得られる巨大分子は、免疫反応性が低下しているが、生物活性は維持されている。この明細書には、巨大分子としてポリペプチド、核酸、脂質などが記載され、グリコール誘導化した巨大分子の結合力は維持されていることが記載されている。

同様に、Allen, Jr.の米国特許第5,284,934号明細書には、1,1-カルボニルージイミダゾールなどのカップリング剤を用いて、ポリエチレングリコール-ヒマ(Ricinus communis)凝集物I (PEG-RCAI)をポリマーに結合させることによって、免疫調節剤または免疫抱合体として用いる糖質結合レクチン誘導体を調製することが記載されている。得られた抱合体は、実質的に非免疫原性であると記載されている。さらに、この特許明細書には、酵素やホルモンなどの巨大分子をポリエチレングリコールに結合させて、実質的に非免疫原性の治療用抱合体を調製することを記載した他の文献も開示されている。これらの文献の全文を、本明細書の一部として引用する。

PEG化することによって、免疫原性が低下して血清クリアランス性が変化した

タンパク質やポリペプチドが得られることが知られている。また、PEGで修飾したプロテクターは代謝不活性化に対して抵抗性を示すことも知られている。以下に示す文献には、タンパク質のPEG修飾の代表例が記載されている。Wang et al., Cancer Res., 53, 4588-4597 (1993) にはキメラ毒素へのPEGの結合が記載され、Rosenberg et al., J. Biol. Chem., 267(32), 2289-2293 (1992) にはアシアロフェツインのPEG修飾が記載され、Somack et al., Free Rad. Res. Comms., 12-13, 533-562 (1991) には過酸ディスムターゼのPEG修飾が記載され、Malik et al., Exp. Hematol., 20, 1028-1035 (1992) にはマクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) をPEG修飾して生物活性を維持した誘導体を生成することが記載され、Tsutsumi et al., Japan J. Cancer Res., 85, 9-12 (1994) には腫瘍壊死因子をPEG修飾することによって抗腫瘍活性を高めた抱合体を生成することが記載されている。タンパク質をPEG修飾すると、場合によっては生物活性が低下することがある (例えば上記Wangらの文献、上記Sumackらの文献、上記Tsutsumiらの文献の該当箇所参照)。しかしながら、結合グリコール残基の量を最適化したり、特定の結合法を採用したり、結合部位などの活性部位をPEG化の間保護しておく保護剤を使用することによって、大抵の場合は生物活性の低下を免れたり軽減したりすることができる。本発明では、特定のリガンド、アンチリガンド、ターゲッティング部分または活性薬剤を、ポリエチレングリコールなどの1つ以上のグリコール残基で誘導化してから、活性試験を行わなければならない。リガンドまたはアンチリガンドあるいはターゲッティング部分の場合は、対応するアンチリガンドまたはリガンドに対するグリコール誘導化部分の結合能をアッセイする結合アッセイ法によって活性を決定するであろう。

典型的な実施態様では、グリコール残基で誘導化する部分はストレプトアビジンまたはアビジンを含むであろう。しかし、グリコールの結合、およびより詳細にはポリエチレングリコールの結合は、プレターゲッティングプロトコルにおいて用いられる活性薬剤やターゲッティング部分と同様に、他のリガンドやアンチリガンドの免疫原性を低下させるであろう。

この実施態様は、リガンド、アンチリガンドまたは活性薬剤が哺乳類に由来しないものであるために、免疫反応を誘導しやすくなっていればとくに有用である

う。しかし、PEG化は、哺乳類のタンパク質に潜在する免疫原性を低下または無くしてしまうか、クリアランス性を変えるために行ってもよい。例えば、ポリエチレングリコール部分をターゲッティング部分に結合することも本発明に含まれる。その場合のターゲッティング部分として代表的なものは、哺乳類に由来するものである。その例として、抗体、抗体フラグメントまたは誘導体、例えば単鎖抗体、Fab、(Fab)₂、Fv、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体であって、ターゲッティング部分がプレターゲット抱合体に含まれているものを挙げることができる。このような誘導化によって、プレターゲット抱合体に含まれるターゲッティング部分に対する望ましくない免疫反応（すなわちHAMA反応）の可能性を低下または無くせるであろう。以上の記載は診断目的で投与する場合にはさほど関係がない。しかし、このような免疫反応は抱合体を所望のターゲット部位に効率よくデリバリーするのを妨げることがあるため、治療目的でプレターゲット法を実施している間に抗体反応が問題を引き起こすかも知れない。

公知のように、ポリアルキレングリコール部分などのグリコール部分を所望の分子に共有結合させる方法が多数知られている。この方法は、タンパク質などの巨大分子のポリアルキレン誘導化に関する上述の文献に記載されている。これらの文献は本明細書の一部として引用する。また、この方法は、Delgado et al., Biotech Appl. Biochem, 252(11), 3578-3581(1977)に記載されている。記載されている代表的な方法は、アミノ基が関与するアシル化反応またはアルキル化反応を行うか、カルボニル残基か活性化（酸化）グリコシル基にこれらの部分を結合させるものである（W094/05332号明細書参照）。

具体的な結合法は、特定のリガンド、アンチリガンド、ターゲッティング部分または活性薬剤上に存在し、グリコール残基を添加して修飾する予定である官能基の種類によって選択することになろう。グリコール残基を結合させるのに相応しい官能基がない場合は、アミノ基、カルボキシ基、グリコシル基などの望ましい官能基を有する化合物と反応させることによって修飾すべき特定化合物に相応しい官能基を導入してもよい。タンパク質やポリペプチドなどの巨大分子に官能基を導入する方法は、当業者に自明である。

本発明のこの側面の典型的な実施例は、アビジンかストレプトアビジンの一方

とポリエチレングリコール部分との抱合体に関する。ストレプトアビジンは、1モルのタンパク質に4モルのビオチンを結合する60Kdの4価タンパク質である。ポリエチレングリコール部分を添加しても、ストレプトアビジンまたはアビジンのビオチン結合能に実質的な影響がないのが好ましい。その影響は、採用する方法、ポリエチレングリコール結合部位、結合したポリエチレングリコール残基の数などの要因に依存する。

本発明の該実施態様に関係する実験例に詳述されるように、ポリエチレングリコール部分とストレプトアビジンとの反応によって、ポリエチレングリコール部分含有ストレプトアビジン抱合体が生成する。しかし、この抱合体の中には、ビオチンによってストレプトアビジンを2-(4'-ヒドロキシアゾベンゼン)安息香酸に置換するHAMAアッセイにおいて、実質的にビオチン結合能を低下させてしまうものもある。だが、この問題も、ポリエチレングリコール残基の結合前に、ビオチン結合部位を効果的に保護しておくことによって実質的に軽減することができる。

適当な保護剤として、特に上記の低親和性ビオチン類似体、ビオチン結合部位に対する抗体などを例示することができる。これらの保護部分はタンパク質に悪影響を及ぼさずに除去することができて、PEG化にも悪影響を及ぼさないものであることが必要である。

ビオチン結合部位の保護は、低親和性ビオチン類似体などのビオチン親和性部位に対して可逆的に結合する部分を、ストレプトアビジンやアビジンなどの特定のタンパク質に結合することによって行うのが好ましい。

ターゲッティング部分、リガンドまたはアンチリガンド、活性薬剤がポリエチレングリコール残基に結合しているときは、ポリエチレングリコール残基を結合する前に、結合部位などの活性部位を保護するか、ポリエチレングリコール残基の数を減らすことが必要とされることもある。

本発明は、哺乳類レシピエント内のターゲット細胞部位における超抗原活性薬剤の局在量を増やすことによって、炎症反応を誘導する方法も提供する。該方法は以下の工程を含む。

ターゲット細胞部位に局在化し得るターゲッティング部分、アビジンまたはス

トレプトアビジンを含む第1の抱合体をレシピエントに投与する工程、

続けて、超抗原活性薬剤とビオチンを含む第2の抱合体を投与する工程。(第2の抱合体の大部分は腎排出によってレシピエントから除去されるのが好ましい。超抗原はターゲット細胞部位に局在化し、それによってレシピエントの免疫系の炎症反応を誘導するであろう)

本発明のこの方法は、循環する第1の抱合体を肝細胞レセプターに誘導することができクリアリング剤をレシピエントに投与し、それによって循環する第1の抱合体量を第2の抱合体投与前に減らしておく工程を含んでもよい。あるいは、他のクリアリングメカニズムやクリアリング剤を使用してもよい。

天然の超抗原の大部分は、実際に超抗原が誘導する炎症反応が全身を実質的に侵さない速度で、腎経路を通して迅速に排出してもよい。天然型超抗原の大部分が腎臓を通して排出されないか、十分な速度で排出されない場合は、超抗原または超抗原を含む抱合体が化学的に修飾されて腎排出できるようにする。好ましくは、超抗原を1つ以上の非肝細胞レセプターを認識する糖質部分で誘導化するか、スクシニル化してもよい。または、超抗原を1つ以上の肝細胞レセプター認識糖質で誘導化して肝排出させるようにしてもよい。本発明を実施するために使用する超抗原として好ましいのは、ブドウ球菌性腸毒素(staphylococcal enterotoxin) Aである。

また、本発明は、哺乳類のレシピエント内のターゲット細胞部位に局在化する活性薬剤量を増やす方法も提供する。この方法は以下の工程を含む。

ターゲット細胞部位に局在化し得るターゲットティング部分、アビジンまたはトレプトアビジン、および抗原不存在下でターゲット細胞部位で炎症反応を誘導することができる超抗原を含む第1の抱合体をレシピエントに投与する工程、

続けて、活性薬剤およびビオチンを含む第2の抱合体をレシピエントに投与する工程。

超抗原が誘導する炎症反応によって、ターゲット細胞部位における第2の抱合体の局在化量をより増やすか、ターゲット細胞部位において第1の抱合体または第2の抱合体をより均一に分布させることができる。また、上述のクリアリング工程を施してもよい。この方法は、サイトカイン、治療または診断用放射性核種

毒素などの適当な活性薬剤とともに実施してもよい。

あるいは、プレターゲットティングプロトコルの予備工程として、ターゲットティング部分－超抗原抱合体を用いるのもよい。このプレターゲットティングプロトコルは以下の工程を含む。

ターゲットティング部分－超抗原抱合体をレシピエントに投与する工程（抱合体はターゲット細胞部位に結合している第1のエピトープに局在化し、超抗原はターゲット細胞部位において炎症反応を誘導する）、

ターゲット細胞部位に結合した第2のエピトープに局在化し得るターゲット部分とアビジンまたはストレプトアビジンを含む第1の抱合体をレシピエントに投与する工程（第1のエピトープおよび第2のエピトープは同一であっても異なっているともよい）、

続けて、活性薬剤とビオチンを含む第2の抱合体をレシピエントに投与する工程（第2の抱合体の大部分はレシピエントから腎排出により除去される）。

請求の範囲に記載される発明をこの側面で実施する際に、上述のクリアリング法のいずれかを用いて、ターゲットティング部分－超抗原、ターゲットティング部分－アビジンまたは－ストレプトアビジン、またはその両方をクリアしてもよい。本発明のこの実施態様において、超抗原はターゲット細胞部位で局在化した炎症反応を誘導し、それによって、第1の抱合体と第2の抱合体のターゲット細胞部位へのターゲットティングを強めることができる。また、本発明のこの側面は、種々の上記活性薬剤とともに実施してもよい。

超抗原は、インターナリゼーションや抗原の存在を必要とせずに、レシピエントにおける免疫反応を誘導し得る高免疫原性分子である。本明細書で論じる超抗原の典型例は、ブドウ球菌性腸毒素Aである。超抗原は異種のTリンパ球の活性を強く刺激することが知られている。この活性化によって、TNF、IL-1、IL-6、INF- γ などのサイトカインのウェーブが発現することもある（Miethke et al., *Immunobiol.*, 189(3-4), 270-284(1993)参照）。また、超抗原が、超抗原を発現するウイルスが潜伏するB細胞の増殖を刺激することもある（Irwin et al., *J.*

Leukocyte Biol., 54(5), 494-503(1993))。

インターナリゼーションや抗原の存在を必要とすることなく、レシピエント内で免疫反応を誘導し得る高免疫原性分子（超抗原）が、本発明を実施するうえで有用である。超抗原として、ブドウ球菌性や連鎖球菌性エキソトキシンなどのバクテリアまたはマイコプラズマエキソプロテイン、Mycoplasma arthritidisが産生するエキソプロテイン、乳癌ウイルスをコードしたしたMla抗原などのウィルス性抗原などを例示することができる。この他の超抗原も、当業界で知られている。例えば、本明細書の一部として引用する以下の超抗原に関する論文を参照：Irwin et al., J. Leukocyte Biol., 54(5), 495-503(1993); Zumla, Clin. Infect. Dis., (15(2), 313-320(1992); Kotb, Current Opin. Infect. Dis., 5(3), 364-374(1992); Johnson et al., Proc. Soc. Biol. Med., 198(3), 765-771(1991); Webb et al., Current Opin. Immunol., 6(3), 467-475(1991); Fleischer, Berhrin. Institute Metteilungen., 94, 104-112(1994); Lafon, Medecine-Sciences, 10(1), 78-82(1994); Uchiyama et al., Microbiol. Immunol., 38(4), 245-256(1994); Scherer et al., Annual Rev. Cell. Biol., 9, 101-128(1993); Misfeldt, Eus-Riv Immun. Immunofarmacol., 13(2), 150-154(1993); Licastro et al., Int. J. Biochem., 25(6), 854-852(1993)。本発明の実施に好ましい超抗原は、ブドウ球菌性腸毒素Aである。例えば、本明細書の一部として引用する Dohlsten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9287-9291(1991)参照。

本発明の好ましい超抗原は、腎経路で大部分が排出される構造を有するか、そのような構造を有するように分子設計されたものであるのが好ましい。または、迅速にクリアされてターゲット細胞部位に局在化した炎症反応を行わせるものであるのが好ましい。非末端糖質残基が存在しない天然の超抗原やこれに類する超抗原を、本発明で用いることもできる。また、上述の原子団を有するように化学的に修飾された超抗原を、本発明の実施に際して使用することもできる。または、本明細書中の毒素含有活性薬剤の説明に記載されるようなスクシニル化、ポリマー誘導化、DPTA誘導化などの上記以外の化学的修飾を超抗原に施して、超抗原の腎排出を強めてもよい。

1つ以上の糖質残基を有するように超抗原を化学的修飾するために、ガラクトースを用いてヒト血清アルブミンを誘導化する方法として本明細書に記載されているものと類似する方法を実施してもよい。

これらの分子は、レシピエント内で炎症反応を誘導する。これによって、(1)ターゲット細胞上に細胞毒性を及ぼすか、(2)ターゲット細胞部位に活性薬剤がより局在化するか（活性薬剤は超抗原自身か本明細書に記載される他の活性薬剤の1つである）、活性薬剤のターゲット細胞部位における分布がより均一になるか、あるいはこれらの複数が誘導されることがある。

本明細書に記載されるように、毒素やその他のタンパク様部分がビオチンに抱合するのと同様にして、ブドウ球菌性腸毒素Aなどの超抗原をビオチンに抱合してもよい。例えば、ビオチンの末端カルボキシ基を活性エステルに転換して、その活性エステルと超抗原のリジン残基のアミノ基とを反応させる。Afford et al., *Meth. Enzymol.*, 184:160-162(1988) に記載されるように、可逆的タンパク分解によって好ましいモノビオチニル化を行うように設定された方法で、ビオチンを超抗原のカルボキシ末端に結合させてもよい。本明細書に記載されるように、毒素またはその他のタンパク様部分を抱合させるのと同様にして、超抗原をアビジンまたはストレプトアビジンに抱合させてもよい。本発明のこの側面の態様において、活性薬剤の局在化を強めるためにストレプトアビジンへ抱合させるのが有利な場合がある。

例えば、10kDデキストラン、それよりも大きなデキストラン分子（分子量約20ー約70kD）、ポリグルタメート（分子量約5ー約50kD）、スクシニル化ポリリシン（分子量約5ー約50kD）などの親水性ポリマー、および、スクシニル化した他の巨大修飾型ポリリシンおよび特定のオリゴ糖（すなわち、実質的に肝臓および他の器官の取り込みに勝り、グロムラー濾過によって腎排出させるのに十分な大きさを有し、構造が化学的に明確であるように合成したオリゴ糖）などの生体内分布検出分子を用いて誘導化することによって、超抗原を含む抱合体を修飾してもよい。上に例示されるポリマーは腎排出によってレシピエントから除去するため、高分子誘導化によってポリマーを含む抱合体を腎排出させることができる。

ビオチン-ポリマー-ブドウ球菌性腸毒素A抱合体は、市販されているビオチニル化リシン誘導化デキストランポリマー（例えば、ミズリー州セントルイスのシグマケミカル社製のリシン、ビオチン-デキストランに固定しうる）を用いて形成してもよい。リシン誘導化ビオチンの抱合は、例えば超抗原の活性化エステルを用いて、リシンε-アミノ基の反応によって行う。当業界で用いられている活性エステル（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド、ニトロ基やフッ素含有基などの強電子吸引基で置換されたフェノールなど）を、該目的で使用してもよい。あるいは、例えばリシン残基と二官能性試薬であるスクシンイミジル-4-(N-マレイミド-メチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート（SMCC）を上記ビオチニル化条件に類する条件（例えばpH、モル比など）下で反応させることによって活性化した、市販ビオチニル化リシン誘導化デキストランポリマーを用いて、ビオチン-ポリマー-ブドウ球菌性腸毒素A抱合体を形成してもよい。このSMCC誘導化デキストランポリマーには、例えば以下に示すような超抗原の遊離チオ基と抱合し得る反応性マレイミド官能基が含まれている。

別の誘導物として $(DTPA)_n$ （ n は約1から約2）がある。DTPAはDPTA環状無水物などのジエチレントリアミンペンタ酢酸であって、超抗原に元来存在するカルボキシル基または合成により超抗原に導入したカルボキシル基を介してアミド結合によって結合していてもよい。

本発明は、血栓症の新規治療方法と組成物を提供することをも目的とする。血栓症は、西洋の主たる死因であり廃疾である。血栓症の主たるカテゴリーには、急性心筋梗塞形成を引き起こす冠状動脈血栓症、発作を引き起こす脳動脈血栓症、肺塞栓症の素因を与える深静脈血栓症がある。基礎病理学的には冠状動脈症は血管壁のアテローム変性からなるが、臨床学的にはほとんどの心筋梗塞形成は血栓によって引き起こされる。Collen et al, J. Pharmacol. Exp. Therapeutics, 231(1), 146-152(1984)参照。

ヒト疾患の中でも血栓症は重要な疾患とされてきたために、血液の内因性フィブリン系を活性化する化合物を投与することによって *in vivo* で薬剤学的に血栓を溶解することが40年以上行われている。血栓症の治療に用いられる化合物とし

て、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、組織プラスミノゲン活性化剤や、これらの誘導体、切断物、ハイブリッド型を例示することができる。Holvoet et al., Circulation, 87(3), 1007-1016 (1993); Holvoet et al., Blood, 81(3), 696-703 (1993); Bos et al., Biotherapy, 5(3), 187-199 (1992); Verstraete, Cardiovas. Drugs. Ther., 6(2), 111-124 (1992); Neblock et

al., Bioconjugate Chem., 3(2), 126-131 (1992); Haber et al., Thrombolysis: Basic Contrib. and Clin. Prog., XVII, 357pp. (1992); DeBono et al., Thromb. Rev., 6, 537-545 (1991); Runge et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(22), 10337-10341 (1991); Collen et al., Circulation, 82(5), 1744-1753 (1990); Haber et al., Jpn. Circ. J., 54(4), 345-353 (1990); Dewerchin et al., Fibrinolysis, 4(1), 11-18 (1990) 参照。

これらの血栓治療剤の中には、血栓症治療剤として極めて有用であることが証明されているものもある。例えば、組織プラスミノゲン活性化剤(t-PA)は心臓発作患者の治療のために臨床的に用いられている。t-PAは他の血栓症に対しても幾つかの利点を有する。t-PAはヒトに由来しているため、免疫反応に悪影響を与えにくい。この点は、ストレプトキナーゼと対照的である。ストレプトキナーゼはクロットを効率よく溶解するが、微生物に由来しているため免疫反応を仲介することがある。また、t-PAは、ウロキナーゼやストレプトキナーゼなどの他の血栓症治療剤に比べて作用特異性が高い。これは、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化剤(例えばストレプトキナーゼ-ウロキナーゼ)に比べて、t-PAのフィブリンに対する親和性がより高いためである。Collen, Nature, 301, 214-221 (1983) 参照。

クロット溶解剤を投与することによって心臓発作などの血栓症を治療することは、ヒトに対して臨床的に有効であることが知られている。しかしながら、この治療法によると望ましくない副作用が伴う。特に、クロット溶解剤はプラスミノゲンの全身的活性化に関係しており、凝固蛋白質の無差別消化を招くために、治療中に出血する危険性がかなり増す。事実、市販されているクロット溶解剤を投与することは、たとえt-PAであっても、望ましくない副作用(例えば出血症)

を伴う。

これは、t-PAなどのクロット溶解剤を投与しても、そのすべてが所望の部位（すなわちフィブリン含有血液クロット）にデリバーされるわけではない事実になくとも一部は起因していると考えられる。したがって、循環しているプラスミノーゲンとフィブリンが結合しているプラスミノーゲンを無差別に活性化することがある。

血栓症には、投与した治療用タンパク質の活性を中和してしまう免疫反応を仲介することがあるという別の問題もある。上述のように、この問題は微生物に由来するストレプトキナーゼで特に懸念される。しかしながら、t-PAなどのヒトに由来する蛋白質であっても潜在的な懸念がある。この点について、t-PAやウロキナーゼの官能性誘導体やハイブリッド型が多く知られ、開発されている。これらの誘導体は、クロット溶解活性、親和性および／または安定性を増すなどの固有の利点を有しているが、これらの誘導体は変異タンパク質であるために投与によって望ましくない免疫反応を誘導する可能性が高くなっている。特に、特定の誘導体を長期間使用したり、繰返し使用したりすると可能性が高くなる。

このようなクロットなどの溶解剤は、血液クロット溶解などの所望の治療効果を仲介した後も、免疫循環系内に留まることもある。このような場合にも、投与によって凝固タンパク質の無差別な消化を引き起こして、治療中に出血する危険性を高めてしまう。

血栓への血栓治療剤のターゲッティングについても、文献に記載されている。公知のターゲッティング剤として、抗体、単鎖抗体、二重特異性抗体を例示することができる。これらは、フィブリン、架橋フィブリン、損傷内皮細胞と結合する。また、最近、ターゲッティング剤としてアネキシンV（annexin-V）も開発されている（Tait et al., Thrombosis Rev., 75(5), 491-501(1994)）。

本発明は、血栓治療剤を治療目的で投与する処置を含む従来の心臓発作、発作、再狭窄などの血栓治療が抱えている問題を軽減するものである。問題の軽減は、血液クロットなどのターゲット部位へ効果的にデリバーされる抱合体を投与し、場合によっては血栓治療剤の投与前後または投与中にクリアリング剤をさらに

投与して血栓治療剤を迅速にクリアすることによって達成される。特に、続いて投与されるリガンドまたはアンチリガンド血栓治療剤抱合体を所望の部位（すなわち血液クロット）に効果的にターゲッティングさせる抱合体を、血栓治療が必要とされる患者に投与することを含む、プレターゲッティング治療状態によって達成される。

血栓治療剤抱合体をターゲッティングするために用いる抱合体は、ターゲット部位（すなわち血液クロット）に結合するターゲッティング蛋白質を含むのが好

ましい。ターゲッティング蛋白質は、リガンドまたはアンチリガンドに直接または間接的に結合している。ターゲッティング部分として、上と同じものを例示することができ、フィブリン、 α -結合フィブリン、アネキシンVなどのアネキシンタンパク質を例示することができる。その他の適当なモノクローナル抗体は、Oster et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 82, 3465-3468 (1985); Peters et al., British J. Med., 293, 1525-1527 (1986); Sum et al., J. Nucl. Med., 27, 1315-1320 (1986); Delabrier et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 1036-1040 (1989)に記載されている。適当なりガンドやアンチリガンドとして、ビオチン、ストレプトアビジン、アビジン、S-ペプチド、S-タンパク、ヘッドアクチベーターペプチド（HAペプチド）、その他の上記リガンドとアンチリガンドを例示することができる。使用する特定のリガンドまたはアンチリガンドは実質的に非毒性であって、十分な親和性で結合対象部位に結合して、治療剤（すなわちt-PA、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ、これらの誘導體やハイブリッド型などの血栓治療剤）を含む第2の抱合体を効果的に結合させることが唯一求められる。

アネキシンは、血栓治療剤を所望のターゲット部位（すなわち血液クロット）に誘導する典型的なターゲッティング部分である。また、アネキシンは、他の治療または診断剤を活性化血小板を含む部位に誘導するために使用することもできる。好ましい実施態様では、ターゲッティング部分は、活性化血小板に対するK_dが 10^{-9} MであるアネキシンVを含む（Thlagarajan et al., J. Biol. Chem., 265(29), 17420-17423 (1990)参照）。他の適当なターゲッティングタンパク質として、活性化血小板に結合する抗体やその他の部分を例示することができる。

アネキシンは、一般に分子量約33-72KDの単鎖非グリコシル化タンパク質である。その例外として最も注目すべきものがアネキシンIIである。アネキシンは、カルシウムイオンが介在する結合が関係する生物活性を多数有している。

研究の結果、アネキシンはミリモル濃度のカルシウム存在下でアニオン性膜脂質と高い親和性で結合することが示されている。カルシウムの存在下では、これらのタンパク質は、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチド酸、ホスファチジリノシトールなどの負に帯電したリン脂質に対して特に高い親和性を示す。例えば、Funakoshi et al., Biochem., 26:5572-78(1987);

Tait et al., Biochem., 27:6268-76(1988)参照。このような負に帯電したリン脂質は、血管の血栓（例えば、活性化ヒト血小板表面に局在化する）と結合する。

アネキシンは抗凝固作用を示す。凝固抑制は、アネキシンが負に帯電した表面リン脂質（例えば、活性化血小板の表面に存在する）に結合することによって起こる。この結合が、負に帯電した表面リン脂質によるクロッティング因子の活性化を阻害すると考えられている。アネキシンは、アニオン性リン脂質を有するターゲット部位に迅速に局在化する。すなわち、アネキシンは、アニオン性リン脂質の循環量に応じて約5-30分で局在化するが、血清中にはそれよりもやや長い時間循環し続ける（循環半減期は39分未満）。

このような性質を有するために、アネキシンや診断剤または治療剤に抱合しているアネキシンを、DVT（深部静脈血栓）、PE（肺塞栓症）、心筋梗塞形成、心房細動、人工心臓血管材料に起因する問題、発作などの多くの徴候に対応した血管血栓診断または治療用プロトコルで用いてもよい。

本発明を実施するうえで有用で好ましいアネキシンの中に、豊富なアネキシン産生源であるヒト胎盤から1979年にBohnによって単離され、胎盤タンパク質4（PP4）と称されたアネキシンVがある。アネキシンVは大腸菌内で発現する。アネキシンVの全長cDNAクローンはすでに得られており、発現ベクター中でサブクローニングされて、アネキシンVを含む融合タンパク質の製造ができるようになっている。アネキシンVは4つのドメイン（アミノ酸残基約75の4つの縦列不完全反復単位；Funakoshi et al., Biochem., 26,8087-92,1987）からなり、各ドメ

インは5つのアルファ螺旋で構成されている。アネキシンV分子は、側面から見ると凸面表面に4つ以上のカルシウム結合部位を有するクラウン状をしており、その結合部位を通してアネキシノーリン脂質相互作用が仲介される。本発明では、この他のアネキシン分子もまた有用である。本明細書のアネキシンVに関する説明は、他のアネキシン分子にも一般に当てはまる。

アネキシンVには複数のカルシウム結合部位が存在し、負に帯電したリン脂質に結合しているアネキシンVはカルシウムによって仲介されることから、1つ以上の各アネキシンVドメインを有する設計分子をプレターゲティングイメージ

ングまたは治療用プロトコルで使用してもよい。また、アネキシン分子をドメイン境界とは異なる位置で分配して、カルシウム介在下でアニオン性リン脂質を結合し得る設計分子を提供してもよい。また、アニオン性リン脂質に対するアネキシンVの親和性を有意に害しない条件下で、アニオンVの1つ以上のアミノ酸残基に変化を加えてもよい。リン脂質に結合しているアネキシンの量は、Tait et al., *J. Biol. Chem.*, 264:7944-49(1989)に記載されるように、蛍光クエンチングによって測定することができる。

アネキシンの中でも、アネキシンVが、血漿および細胞外液に匹敵する条件下（1.2mMイオン化カルシウム、0.15Mイオン強度）で、80%のホスファチジルクロリンと20%のホスファチジルセリンを含有するリン脂質分泌小囊に対して最も強い結合親和性（ $K_d < 10^{-10} M$ ）を示す。この結合は可逆的であり、カルシウム依存性である。

非ターゲット部位に対する結合量を減らしてクリアされる量を増すために、ターゲティング部分を誘導化してクリアされるようにしてもよい。例えば、アネキシンをヘキソースまたはヘキソースを主成分とする部分で誘導化して、クリアされるようにすることができる。例えば、アネキシンを1つ以上のヘキソース（アシュウェル（Ashwell）レセプターまたはその他の肝臓レセプター、例えば内皮細胞および／または肝臓のクッパー細胞に結合しているマンノース／N-アセチルグルコサミンレセプター、もしくはマンノース-6-ホスフェートレセプターによって認識される六炭素糖）を含むように誘導化してもよい。このようなヘ

キソースまたはヘキソースを主成分とする部分として、ガラクトース、マンノース、マンノース6-ホスフェート、N-アセチルグルコサミン、ペンタマンノシルホスフェートなどを例示することができる。アシュウェルレセプターによって認識される部分として、この他にグルコース、N-ガラクトサミン、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースのチオグリコシド、D-ガラクトシド類およびグルコシド類全般なども、本発明を実施するうえで使用することができる。本明細書の記載に基づいて、当業者は第1のまたは第2の抱合体のいずれかをクリアするためのクリアリング剤を設計することができる。

ガラクトースは、本明細書の目的に沿う典型的なクリアリング剤である。ガラクトースチオグリコシドとタンパク質との抱合は、Lee et al., "2-Imino-2-methoxyethyl 1-Thioglycosides: New reagents for Attaching Sugars to Proteins", Biochemistry, 15(18):3956(1976)の教示にしたがって行うのが好ましい。この他にも、Drantz et al., "Attachment of Thioglycosides to Proteins: Enhancement of Liver Membrane Binding", Biochemistry, 15(18), 3963(1976)に有用なガラクトースとチオグリコシドの抱合法が記載されている。

放射性キレートを使用するプレターゲットイメージング法にアネキシンを用いるときは、放射性核種とキレートとの複合体を形成する前か（形成前法）後に（形成後法）、化学的手段によってヘキソースとアネキシンの抱合体を形成することができる。しかし、化学的手段によるヘキソースの抱合体形成は、キレート抱合体形成の前に行うのが好ましい。

調製する抱合体上に存在するガラクトース残基の数は、1以上でアネキシンのターゲットに対する結合親和性を有意に減じない数以下の範囲にする。例えば、ガラクトース誘導化後も、ガラクトースが元来有しているアネキシン結合活性の20%以上を保持しているのが好ましく、50%以上を保持しているのがより好ましい。アネキシン分子上に存在するガラクトース残基数は、理論上は最大で22である（アネキシン分子構造内のリシン残基の数）。放射線標識を施した本発明のアネキシナーガラクトース抱合体は、例えば1-約5個のガラクトース残基を有している。

本発明の実施に際して、ヘキサースクラスターを使用するのが好ましい。このとき、i) クラスターのガラクトース数と、ii) ガラクトースクラスターとアネキシシン抱合体成分との距離などを考慮して検討する必要がある。ガラクトースクラスターは、本発明の目的に沿った使用ができる典型的なヘキサースクラスターである。これについて文献には、ヒト肝細胞の表面にあるガラクトースレセプターはヘテロトリマー、おそらくはビスーヘテロトリマーとして集合しており、場合によっては各ガラクトースクラスターは3つ以上のガラクトース残基を有していることが示唆されている。また、各トリマーのガラクトースレセプターは、互いに15、22および25オングストローム離れている。したがって、クラスターのガラクトースは、25オングストローム以上離すことができる柔軟なリンカーによっ

て分けられているのが好ましい。アネキシシンとガラクトースクラスターとの距離は、ガラクトースクラスターのサイズや配向に影響を与え得る、アネキシシンのターゲットへの結合に及ぼす立体効果を除去するのに十分であるべきである。この距離は、約10オングストロームより大きいのが好ましい。ターゲット部分は、ビオチンまたはその類似体に結合するのが好ましい。

プレターゲットング剤を投与した後に、直接または間接的にリガンドまたはアンチリガンドに結合している診断剤または血栓崩壊剤（例えばt-PA、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼまたはこれらの変異体、誘導体またはハイブリッド型）を含む第2の抱合体を続けて投与する。該リガンドまたはアンチリガンドは、プレターゲットング剤に含まれるリガンドまたはアンチリガンドと結合する。例えば、プレターゲットング剤がビオチンを含む場合、アンチリガンドはアビジン、ストレプトアビジンまたはその他のビオチン結合性タンパク質であろう。したがって、本発明のこの実施態様で使用するのに適した第2の抱合体には、t-PA-アビジン、t-PA-ストレプトアビジン、ウロキナーゼ-アビジン、ウロキナーゼ-ストレプトアビジンおよびストレプトキナーゼ-ストレプトアビジンなどが含まれる。

血栓崩壊剤の抱合体を投与する前にプレターゲットング抱合体を投与すれば、血栓崩壊剤の非特異的結合に伴う問題を実質的に軽減することができる。この

ため、出血反応などの望ましくない副作用を軽減または防ぐことができる。さらに、血栓部位をターゲットするプレターゲッティング抱合体を投与することによって、血栓のイメージング剤などの診断剤（特に放射線核種）をかなり効果的にターゲットすることができる。

上述のように、本発明にはクリアリング剤の投与も含まれる。クリアリング剤として、例えば上で特定したクリアリング剤であって、リガンドまたはアンチリガンドに直接または間接的に結合したものを例示することができる。ここにおいて、該リガンドまたはアンチリガンドは、ターゲットティング部分抱合体に含まれるリガンドまたはアンチリガンドと結合する。例えば、血栓崩壊剤の抱合体がウロキナーゼストレプトアビジンを含む場合は、クリアリング剤は例えばビオチニル化タンパク質、ビオチニル化ガラクトシル化タンパク質、1つ以上のビオチ

ン残基とヘキサース残基（例えばガラクトース残基）を含む小分子のクリアリング剤であって、肝細胞レセプターにより特異的なクリアランスを行うものが効果的である。

上述のプレターゲッティング剤と血栓崩壊剤の抱合体は、当業者に周知の方法により市販されているヘテロ二官能性架橋剤を用いて合成することができる。出血などの望ましくない副作用を起こさずにクロットを効果的に溶解することができる、プレターゲッティング剤、血栓崩壊剤の抱合体およびクリアリング剤の投与量は、当業者が容易に決定することができる。血栓崩壊剤の有効投与量は、血栓崩壊剤の既知の有効投与量とほぼ同じか、それ以下であろう。本発明は血液クロットなどの所望の部位に血栓崩壊剤をよりよくデリバリーすることを目的としているため、効率を上げるために血栓崩壊剤の使用量を少なくすることもある。

クリアリング剤の投与量は、非特異的結合ターゲットティング剤の抱合体を循環系から効果的にクリアすることができる量であるのが好ましい。

本発明は、核酸配列を所望の細胞に誘導することができないという従来法の問題を軽減した新しい遺伝子治療法を提供することをも目的としている。とくに、この改良法は、上述のようなターゲットティング部分（例えば抗体または抗原フラグメント）に結合したリガンドまたはアンチリガンドを含む第1のプレターゲッ

ティング抱合体を投与する工程（抱合体は処置すべき細胞上に発現する抗原に結合する）と、それと同時にそれ続けて、第1のプレターゲットティング抱合体のリガンドまたはアンチリガンドと結合するリガンドまたはアンチリガンドに直接または間接的に結合する核酸配列を投与する工程を含む。

遺伝子治療法には、所望の核酸配列（例えばプラスミドに含まれているもの）をターゲット細胞にデリバリーして安定に挿入する工程が含まれていなければならない。核酸配列はターゲット細胞において安定に維持され、治療効果を奏する。遺伝子治療法に用いる核酸配列として、治療用酵素、薬剤、サイトカイン、上述の治療用タンパク質およびポリペプチドをコードするものを例示することができる。その他にも、特定の疾患条件に関与する遺伝子の発現を活性化、不活性化または変調するために挿入する核酸配列も、遺伝子治療に使用することができる。

例えば、特定の疾患条件下にある特定遺伝子に存在する遺伝性変異体などの遺伝子の欠陥を正すために、遺伝子治療を利用することができる。

遺伝子治療法には、とくに癌を治療する見込みがある。そのような遺伝子治療法は、例えば宿主免疫系を活性化する核酸配列をデリバリーして、異種細胞たる癌細胞上に発現した抗原を認識させ、それによって免疫系を活性化して腫瘍を攻撃する工程を含む。使用する核酸配列の例として、クラス1の異色抗原をコードする遺伝子を挙げることができる。IL-1やIL-2などのインターロイキン、インターフェロン、腫瘍壊死因子などのサイトカインをコードする核酸配列を用いて遺伝子治療を行えば、患者の癌を治療できる見込みもある。また、癌細胞に対して細胞毒性を有する核酸配列（例えば抗腫瘍剤や細胞毒素）または必須細胞機能を阻害する核酸配列を用いて遺伝子治療することも見込みがある。

しかし、癌を治療する見込みがあるとはいうものの、遺伝子治療には1つの重大な欠点がある。とくに、従来の遺伝子治療法は、一般に治療すべき細胞に直接注射することが必要とされている。癌治療の場合は、プラスミドなどの治療用核酸配列を表面癌病巣に直接注射することを要する。

これは、表面癌に対する遺伝子治療の潜在的な効力を制限しているため不利で

ある。したがって、プラスミドなどの核酸配列をターゲットして、全身注射によって癌細胞に導入する遺伝子治療法が極めて有効である。こうすれば、遺伝子治療を様々な癌の治療に有効に利用することができるからである。

この点を実践するために、本発明者らは、例えばプラスミドに含まれているような所望の核酸配列を全身注射によって癌細胞に効果的にターゲットする方法を開発した。この方法は、とくに以下の工程にしたがって実施することができる。

(i) ターゲットにすべき癌細胞上に発現している抗原に特異的なターゲッティング部分に結合しているリガンドまたはアンチリガンドを投与することを含むプレターゲッティング工程、および

(ii) 該癌細胞にデリバリーされ安定に挿入されてから核酸配列を含む活性薬剤を投与して治療する工程（この核酸配列は、プレターゲッティング抱合体に含まれているリガンドまたはアンチリガンドに結合するリガンドまたはアンチリガンドとアソシエートしている）。

「アソシエート」には、核酸配列がリガンドまたはアンチリガンドに直接または間接的に結合する場合が含まれる。または、リガンドまたはアンチリガンドに結合するウィルス粒子やリポソームのようなデリバリー用賦形剤中に核酸配列を被包させる間接的なアソシエートが含まれる。癌細胞へターゲットされるプラスミドのような核酸配列は、後に特定のリガンドまたはアンチリガンドに結合してプレターゲット抱合体に特異的に結合するリポソームに被包しておくのが好ましい。

核酸配列をリポソームに被包させる方法は、当業界では周知である。この方法は、Papahadjopoulosらが核酸やタンパク質などの生物活性材料をリポソームに被包し、これを該生物活性材料を細胞にデリバリーするために用いることを教示した1980年代初期に起源を有する。例えば、Papahadjopoulosらの米国特許第4,241,046号明細書および同第4,235,871号明細書参照。また、Szoka, Jr.らの米国特許第4,394,448号明細書には、DNAまたはフラグメントをリポソームに被包して、リポソームをDNAまたはフラグメントの挿入が起こるように細胞に接触させることによって、該DNAまたはフラグメントを生物細胞に挿入することが教示されて

いる。この方法は、所望の細胞および／または酸を細胞により効率よくターゲッティングするために、近年改良もされた。

例えば、ターゲットにされる細胞に選択的に結合し、それによって所望の細胞へのデリバリー効率を上げる、リポソームとリガンドの抱合体が知られている。特定の抗体における、リポソームと細胞ターゲッティング部分の抱合体を開示した関連特許として、Touetらの米国特許第5,210,040号明細書、Huang, Leafの同第4,957,735号明細書、Huang, Leafの同第4,925,661号明細書、Papahadjopoulosらの同第4,806,466号明細書、Kungらの同第4,762,915号明細書、Huangらの同4,708,933号明細書、Cole, Francis X.の同第4,483,921号明細書、Mylesらの同第4,480,041号明細書、Martinらの同第4,429,008号明細書などを挙げることができる。

ターゲットする核酸を細胞にデリバリーするのを補強するpH感受性リポソームを調製することも知られている。例えば、Leaf, Hungらの米国特許第4,789,633号明細書、HungらのProc. Nat'l. Acad. Sci., USA, 87, 7851 (1987)には、pH 7未満で

細胞膜と融合して所望のDNAを導入することができるpH感受性DNA含有リポソームが開示されている。

DNA含有リポソームを *in vivo* でデリバリーする方法として、さらにカチオン含有リポソームを投与する方法もある。例えば、Sullivanの米国特許第5,227,170号明細書には、所望のオリゴヌクレオチドを含有し、内部水相よりも容量モル濃度が低い二価のカチオン溶液を含むリポソームにオリゴヌクレオチドを被包することが教示されている。また、Felgner et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)には、カチオン性リポソーム複合体が教示されている。しかし、このカチオン性のために、リポソームは血清タンパク質と結合し、その中に含まれているオリゴヌクレオチドを不活性化することがある。また、リポソーム-DNA複合体がオリゴヌクレオチドをヌクレアーゼにさらすことになり、所望の細胞に挿入する前に所望のオリゴヌクレオチドが劣化してしまうこともある。

近年特許になったHuang, Karl J.の米国特許第5,026,552号明細書には、肝臓の実質細胞または非実質細胞にリポソーム被包化合物（例えばポリヌクレオチド）を選択的にデリバリーする方法が教示されている。肝臓は、とくに食作用を有し

クッパー細胞によって仲介される飽和性経路と、飲作用を有し実質細胞によって仲介される非飽和性経路の2つの既知の経路を経てリボソームを取り込む。この方法は、直径が200nm未満で循環半減期が5時間以上であるキャリヤーリボソームを投与することを含む。また、例えばWeinerらの米国特許第5,049,392号明細書に開示されるような、浸透圧依存性のリボソームが文献上で知られている。

リボソームのサイズを最適化する方法も知られている。例えば、MacDonald, Robert C.の米国特許第4,532,089号明細書には、巨大サイズのリボソームを調製する方法が開示されている。また、Huntらの米国特許第4,529,561号明細書には、所望のサイズ範囲を有するリボソームの調製法が教示されている。さらに、Hostetlerらの米国特許第5,223,263号明細書には、リボ核酸含有リボソームと所望の細胞にリボ核酸をデリバリーするためにこれを使用することが教示されている。以上より、当業界では核酸を細胞にデリバリーする多くの方法が、

さらに、核酸配列を被包したリボソームを投与すれば、黒色腫、表面癌の治療に有効であることが報告されている。例えば、最近のBioworld Today, Vol.4, No. 233,1および5では、クラス1移植抗原HLA-B7をコードするcDNAが修飾ラウス肉腫ウィルスプラスミド内に挿入されると、リボソーム様の鞘に包まれ、黒色腫患者の病巣に注入され、肺の転移を効果的に退行させ、注入部位から遠い局所皮膚小節を溶解することが報告されている。しかし、これらの結果を考慮する限り、効果を上げるためには癌病巣に注射することが必要である点がなお不利な点である。

これに対して、本発明の方法はプレターゲッティング工程によって上記技術を改良した。本発明の方法は、リガンド（またはアンチリガンド）ターゲッティング部分抱合体を投与してターゲット部位（すなわち腫瘍細胞）にデリバリーし、核酸配列（例えばプラスミド）を含むリボソームを投与する工程を含む。この方法において、リボソームは、すでにin vivo部位にプレターゲットされている抱合体に結合するリガンドまたはアンチリガンドに結合している。

好ましい実施態様では、核酸配列を含むリボソームは、ビオチン、アビジンまたはストレプトアビジンに結合している。上述の文献に記載されているように、

当業界ではリボソームにタンパク質やその他の化合物を結合させる方法も周知である。最も好ましい態様は、リボソームがビオチンに結合している場合である。これについて、プラスミドDNAを含むビオチニル化リボソームの結合はすでに報告されており（例えばKlibanose et al., Vetn.Akad.Med., Nauk.SSR, 8, 50-54 (1990) および Kitano et al., Biotech.Apl.Biochem., 14, 192-201 (1991) 参照）、 10^{-9} から 10^{-11} の範囲である。

プレターゲッティング法を用いた場合、リガンドまたはアンチリガンド（例えばビオチン）をリボソームに結合させれば、リボソームに被包される核酸配列の薬物速度が実質的に速くなるので好ましい。それは、ターゲット部位（すなわち腫瘍細胞）へリボソームが効率よくデリバリーするからである。

このプレターゲッティング遺伝子治療プロトコルに用いる抱合体は、静脈注射によって投与することができるが、全身投与であればいずれの経路でもよい。ビオチニル化プラスミドを含むリボソーム組成物を、プレターゲットされた（リガンドまたはアンチリガンド）ターゲッティング部分抱合体に続けて投与するのが好ましい。

被包したプラスミドは3キロベース以下、分子量相当で108,000以下であるのが好ましい。このサイズと分子量で、プラスミドを含むリボソームを腫瘍に効果的に局在化し、細網組織球系（RES）に取り込ませる。このプラスミドはターゲット細胞にインターナリゼーションされ、そこでプラスミドに含まれている核酸配列が発現して所望の治療効果を奏する。さらに、このプラスミドのインターナリゼーションを補強するために、核酸を被包するリボソーム膜を、ターゲット細胞膜と融合するように設計するか、被包されるプラスミドDNAをターゲット細胞にインターナリゼーションすることができるよう浸透圧感応性に行うことができる。

リボソームに被包された核酸配列（例えば所望の治療用ポリペプチドをコードする核酸配列を含むプラスミド）の効果的な投与量は、治療する疾患、患者の状態、ターゲットされる特定の核酸配列および発現レベルなどのファクターに依存する。効果投与量や投与養生法は当業者が決定しうる。

本発明は、記述した2段階または3段階プレターゲッティング治療法の効率を、ターゲットする活性薬剤の効果を強化する「感作剤」（例えば放射性活性剤や化学治療活性剤）を投与することによってさらに良くすることを目的とする。

この点に関して、ある種の細胞（すなわち酸素欠乏細胞）が活性剤（例えば放射性および化学療法活性剤）の作用に抵抗性を示すことが知られている。化学治療養生法の中には酸素依存性のものがあるため、ある種の化学治療剤を用いた場合にこのような抵抗性を示すものと考えられている。特に、この方法の効果を上げるためには、活性細胞を生長させて細胞増殖させるために酸素が必要とされることがある。これは、用いる組成物が非活性生長細胞を効果的に殺すことができないためである。また、酸素欠乏細胞には蓄えられているエネルギーが少ないため、化学治療剤を細胞膜を通して輸送する能力が低いと考える研究者もいる。当然ではあるが、この問題が深刻であるのは、所望の細胞毒性効果を奏するためにインターナリゼーションが必要とされるときだけである。

ターゲットにする部位（例えば腫瘍）に多数の酸素欠乏細胞が含まれているときは、酸素欠乏細胞を殺すが正常細胞に悪影響を及ぼさない放射性活性剤または化学治療活性剤を十分な量投与することが困難なことがある。この問題は、特に形態学的に比較的多くの酸素欠乏細胞を含みやすい固体腫瘍に広く存在する問題である。

この点について、感作剤を投与することによって、放射性または化学治療活性剤の酸素欠乏細胞に対する効果を強化しうることが報告されている。感作剤には、一般に特定の活性剤（例えば、酸素欠乏細胞やその他の抵抗細胞に対する放射性材料または化学治療剤）の細胞毒性を高めることができる化合物が含まれている。このような感作剤は当業者に周知である。

感作剤として効果的なのは、酸素キャリアーである。しかし、それだけでは十分な性質を有しているとはいえない。また、以下の性質の少なくとも1つを有する化合物が好ましく、以下のすべての性質を有する化合物がさらに好ましい。

i) 酸素欠乏腫瘍細胞を特徴づける密集細胞群またはその血管系に迅速に輸送され得ること、

ii)哺乳動物系における滞留時間が望ましいこと（すなわち、排出による除去、輸送または代謝による除去が速すぎず、かつ、肝臓や脾臓などの系内に過度に蓄積しないこと）、

iii)正常細胞（euoxic cells）に対して毒性がほとんどないか全くないこと

この化合物を全身投与すると、血管系を通して迅速に拡散し、肺の酸素を取り込んで、心臓血管系内に治療に十分な時間留まり、過度に毒性を示すことなく迅速に除去されるのが理想である。この化合物の滞留時間は、約10-12日であるのが好ましい。しかし、2-8時間といったオーダーの短い滞留時間であっても、例えば放射性化合物をターゲット部位にデリバリーするプレターゲッティング治療プロトコルなどの短時間治療を行う場合には十分であることもある。

本発明は、記載した治療用プレターゲッティング法の中にこれらの感作剤を投与することを含む。また、本発明は、酸素欠乏細胞に対する細胞毒性剤の効果を強化（感作）する化合物やその化合物を含む組成物を投与することを含む。

酸素欠乏細胞に酸素を輸送する感作物質の具体例は当業界では周知であり、例えば1988年5月3日に特許されたYuhasらの米国特許第4,742,050号明細書に記

載されるペルフルオロ化合物やそれを含む組成物、1989年9月12日に特許されたLong, Jr.の米国特許第4,865,836号明細書および1992年1月14日に特許されたLong, Jr.の米国特許第5,080,855号明細書に記載される臭化ペルフルオロカーボン化合物とそれを含むエマルジョン、1989年3月2日に特許されたMcIntoshの米国特許第4,815,446号明細書に開示されるペルフルオロカーボン化合物、1989年12月26日に特許されたYuhasらの米国特許第4,889,525号明細書に開示されるペルフルオロカーボン化合物およびそれを含む分散剤、Rockwell et al., Radiotherapy and Oncology, 22, 92-98 (1991) および Rockwell et al., Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 22, 87-93 (1992) に記載されるペルフルオロオクチルブロミドエマルジョンを例示することができる。このリストは、放射線治療剤および化学治療剤用の市販感作剤の代表例である。これらの文献は本明細書の一部として引用される。

このプレターゲッティングプロトコルで使用する具体的な感作剤は、さまざま

なファクターを考慮して選択する。そのようなファクターの中には、治療が放射線療法、化学療法またはその両方のいずれを利用するか、酸素欠乏部分の性質と位置、感作剤であるペルフルオロ化合物またはヘモグロビンの効力、正常細胞やホスト哺乳類に対する酸素供給剤の毒性、酸素欠乏細胞域に迅速に拡散するために十分に小さい粒径を有する分散剤と十分に安定な分散剤の形成能、哺乳類における蓄積傾向を含む滞留時間、これらに類する感作技術分野で知りうる事項の検討が含まれる。特に酸素輸送能、分散粒子のサイズや安定性、哺乳動物の滞留時間、細胞毒性に関する感作剤選択のガイダンスは血液置換技術から得ることができる。

本明細書で使用する「ペルフルオロ化合物」または「ペルフルオロカーボン」は、実質的にフッ化されているか、完全にフッ化されている材料である。これらは、周囲温度と圧力で一般に液体であるが、液体でなければならない必要はない。本明細書において「実質的にフッ化された」とは、さらに化合物に存在する水素原子を置換しても材料の酸素輸送能を実質的に上げることができない程度に、化合物に存在する水素原子の大部分がフッ素原子で置換されていることを意味する。水素原子の約80-90%以上がフッ素原子で置換されているときに、実質的にフッ化されたレベルに到達するものと考えられる。しかしながら、好ましくは約95%以上の水素原子、さらにより好ましくは98%以上の水素原子、最も好ましくは100%の水素原子が置換されているのがよい。上述の米国特許第3,911,138号明細書および第4,105,798号明細書によると、酸素輸送能は酸素などの気体の材料に対する溶解性に関係している。この特許明細書によると、ペルフルオロ化材料は、25℃、760mmHgにおいて100mlあたり酸素を10-100ml吸収する。

プレターゲッティング法に有効に用いられるペルフルオロ化合物として代表的なものは、化学的に不活性なC₉₋₁₈ポリサイクリック化合物（例えばビシクロ[3.3.1]ノナンおよびトリメチルビシクロ[3.3.1]ノナン、3-メチルビシクロ[3.3.1]ノナンおよびトリメチルビシクロ[3.3.1]ノナン）、アダマンタンおよびアルキル（C₁-C₆）アダマンタン（例えば、メチルおよびジメチルアダマンタン、エチルおよびジエチルアダマンタン、トリメチルアダマンタン、

エチルメチルアダマンタン、エチルジメチルアダマンタンおよびトリエチルアダマンタン、メチルジアダマンタンおよびトリメチルジアダマンタン)、メチルおよびジメチルビシクロオクタン、テトラヒドロビノール-S、ピナン、カンファン、デカリンおよびアルキルデカリン(例えば、1-メチルデカリン、1,4,6,9-ジメタノデカリン、ビシクロ[4.3.2]ウンデカン、ビシクロ[5.3.0]デカン、ビシクロ[2.2.1]オクタン、トリシクロ[5.2.1.0^{2,6}]デカン、メチルトリシクロ[5.2.1.0^{2,6}]デカン)およびこれらの混合物のペルフルオロ化誘導体を挙げることができる。ヘテロ原子ペルフルオロ化合物の例として、F-トリブチルアミン、F-トリプロピルアミンおよびF-N,N-ジメチルシクロヘキシルメチルアミン、ペルフルオロエーテル(例えばF-2-ブチルテトラヒドロフラン、F-2-ブチルフラン、F-ヒドロフラン、F-(2,5,8-トリメチル-3,6,9-トリオキサ-1-ドデカノール)の1,2,2,2-テトラフルオロメチルエーテル)、F-N-メチルデカヒドロキノリン、F-1-メチルオクタヒドロキノリジン、F-オクタヒドロキノリジンおよびFN-シクロヘキシルピロリジンを挙げることができる。芳香族および脂肪族化合物の例として、F-ナフタレン、F-1-メチルナフタレン、F-n-メチル-モルホリン、F-n-ヘプタンおよび1,2-ビスノニルフルオロブチルエチレンを挙げることができる。

水性媒体中にペルフルオロ化合物を均一に分散する分散剤は既知であり、例えばノニオン性界面活性剤を含む。全身投与以外の方法(例えば局所治療)で使用する分散剤の場合などは、フルオロ化合物を分散するためにイオン性または両性界面活性剤を使用することができる。全身処置をする場合は化合物の生理学的受容性(例えば等張性)に対して慎重に注意を払う必要があるため、イオン性界面活性剤を使用するのはさほど望ましくない。もっとも、電解質またはその他の添加剤を用いて分散剤を形成することによって、イオン性界面活性剤のイオン特性を補ったり緩和したりすることは可能である。分散剤として適当なものは、上記参照刊行物に記載されている。

このプレターゲッティング法において増感剤として用いる酸素輸送性ペルフルオロ化合物は、動脈、静脈、筋肉、腹腔または経口のいずれであるかに拘わらず、哺乳類に局所投与しても全身投与してもよい。分散剤は全身投与して、ある部

位

で分散剤が肺をトラバースして酸素を取り込み、取り込んだ酸素を酸素欠乏腫瘍細胞に輸送するのが好ましい。分散剤の投与量は、酸素欠乏部位とその性質、処置が高圧酸素処置を補うために行うか否か、特定の組成物に対する哺乳類の全身耐性（毒性）、セラピストに既知のその他のファクターを考慮して予め決定しておくことができる。一般に、ペルフルオロ化合物（PFC）の血中濃度（血液100mlあたりのペルフルオロ化合物のml）は約3-10%にする。場合によっては、これより多いか少ない血中濃度で十分であったり、そのような血中濃度が必要とされたりすることもある。高圧酸素処置やその他の一次酸素注入を補うために投与するときは、血中濃度は3.5%未満にすることが必要である。吹き込んだ空気中の酸素の部分圧は、100%酸素で約2気圧以下にすることができる。ほとんどの場合は、最大限の100%酸素2気圧で30分間高圧酸素処置を行う。この条件は、耐え得るレベル内で良好であることが知られている。しかしながら、一次酸化の時間、内容物および圧力も、哺乳類または患者の健康状態、酸素欠乏部位、その他の放射線または化学セラピストに自明な条件などの様々なファクターに依存する。

ペルフルオロ化合物の分散剤を酸素欠乏細胞または血管系腫瘍細胞と接触させて、ペルフルオロ化合物によって運搬されている酸素を腫瘍／血管系境界に輸送することができる。換言すれば、ペルフルオロ化合物の分散剤と酸素欠乏細胞が直接接触するのが理想ではあるが、達成するのが困難であり、現実には要求されない。これは、腫瘍塊に常に存在する過剰な酸素が塊全体に広がって、その結果酸素欠乏細胞に届くためである。

照射および／または化学療法を行う前に投与する増感剤の投与量も、ペルフルオロ化合物が酸素欠乏腫瘍細胞に至る速度、要求される増感の程度、心臓血管系および酸素欠乏組織における分散剤の心臓血管内半減滞留時間などの種々の条件によって制御される。短時間照射処置のように、心臓血管内（結成）半減期が約2-4時間であれば受容しうる処置もある。この時間は、ペルフルオロ化合物が迅速に酸素欠乏腫瘍細胞に移動し、その酸素を細胞に輸送する時間を示している。

これについて本発明では、粒径が極めて小さくて、その粒径をかなり長期間維持するという優れた性質を有する分散剤を使用するのが好ましい。粒径が小さけれ

ば、分散剤を血管系を迅速にトラバースして酸素欠乏部位に至らしめることができる。そのような例として、観察される平均粒径が0.05-0.2ミクロンであって、数カ月から1年以上その粒径を維持するものを挙げることができる。

哺乳類の体内に吹き込む前に分散剤を酸素化しておいてもよい。酸素化しておけば、肺や動脈からの酸素輸送が予測される部位よりも、酸素欠乏部位かその近傍に注射することができるので便利である。このような予備的酸素化は、投与前に酸素または空気を用いて分散剤を入れた容器をフラッシュするか覆うか、あるいは投与前の分散剤に酸素または空気をバブリングする方法によって行うことができる。分散剤の投与を高圧酸素処置を補うために行う場合も、記載した方法で予備的酸素化をすることができる。しかし、予備的酸素化を行うときには必ず、酸素欠乏腫瘍細胞域に分散剤が至る前（分散剤を細胞に輸送する間）に酸素をロスする可能性がある。このため、予備的酸素化は一般に好ましくない。

放射線治療の種類、適用様式および適用部位については周知であり、詳細な説明を必要としない。しかし、生体外適用または放射線源を酸素欠乏部位かその近傍に生体内適用することによって放射線照射を行うことができることは明らかである。したがって、放射線照射はX線、ガンマ線、中性子やそれに類するもの、埋込型ラジウム、イリジウムまたはセシウム源を用いて行ってもよい。1日200ラド、1週間に5日ずつ6週間行う通常の放射線治療を行うことができるが、投与量や処置の総期間は状況の詳細に応じて調節してもよい。

本発明のプレターゲットティング法とともに増感法を行えば、細胞がサスペンション（白血病の場合など）であるか固体であるかに拘わらず、あらゆる種類の酸素欠乏腫瘍細胞に対して効果を奏するであろう。本発明では、固体腫瘍に対して特に効果がある。分散剤は迅速に全身に分布するため、基本的に本発明の好ましい分散剤の粒径は極めて小さくて安定であるために、本発明にしたがって実際に酸素欠乏部位を増感してもよい。

酸素欠乏腫瘍細胞を破壊するか制御するために、化学療法を放射線療法と組み

合わせて行うことが多い。このため、本発明の増感技術を化学療法や放射線療法と同時かあるいは後に行うことができる。二重治療を行う場合は、脳血管滞留時間が2つの療法の実施期間を効果的にカバーするように増感剤分散剤を選択する

のが一般的である。滞留時間が短い場合には、増感剤投与量を適当に増やすか調節することができる。化学治療剤を細胞に活発に輸送し、細胞循環を制御するか化学治療剤を増強するためには酸素が必要であるという意味で、化学治療剤は酸素依存性であることが知られている。このため、酸素は遊離型かキャリアーにより供給されなければならない。ペルフルオロ化合物とその分散剤は酸素を大量に輸送することができるため、薬物を放射線治療剤とともに形成することによるか、あるいはその後に放射線治療剤と化学治療剤を投与することによる、酸素依存性の薬物を用いた化学療法も有利である。メトトレキセートは化学治療薬のひとつであり、細胞に活発に輸送するためには酸素が必要であると考えられている。ビンブラスチンとビンクリスチンは細胞循環用の酸素を必要とする薬物である。

酸素依存性ではない可能性がある化学治療薬は、本発明の増感技術と組み合わせ投与してもよい。このような薬物の例として、アンドロゲン、エストロゲン、アンチエストロゲン、プロゲステロン、副じんステロイド、ナイトロジェンマスタード、クロラムブシル、フェニルアラニンマスタード、シクロホスファミド、チオ-TEPA、ブスルファン、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド、アドリアミシン、ダクチノムチン、ダウノムチン、ブレノムチン、ミトラマイシン、ミトムチン-C、BCNU、CCNU、メチル-CCNU、DTIC、ヒドロキシウレア、シスプラチナ（シスプラチナ(II)ジアミンジクロリド）、プロカルバジン、ヘキサメチルメラミン、L-アスパラギナーゼなどを挙げることができる。

放射線治療剤として有用であるがラジopakも有するこれらのフルオロ化合物は、特に本発明にとって有用である。そのようなフルオロ化合物の例として、臭化ペルフルオロヒドロカルボン（例えばF-ペルフルオロオクチルブロミド）や臭化ペルフルオロエーテル（例えばF-1-ブロモブチルイソプロピルエーテル、F-1-ブロモエチルイソプロピルエーテル、例えば米国特許第3,453,333号

明細書に記載されるその他の臭化ペルフルオロ有機エーテル)を挙げることができる。これらの化合物が有する放射イメージング特性によって、これらの放射線治療剤の効果と周囲の正常細胞に対する毒性をモニタすることができる。このため放射線治療剤として機能するのみならず、診断剤としても機能する。しかし、

ペ
ルフルオロ化合物が放射性を示さない場合は、上と同様に放射線増感力をモニタする機会を作り出すために、ペルフルオロ化合物を含有する分散剤を他の既知のラジオパク剤を用いて形成してもよい。放射線イメージングは、通常のX線撮影またはコンピューター連動断層撮影(CAT)に用いたり、より新しいNMR技術に利用してもよい。放射線治療剤としての臭化物は、水性分散剤中かその近傍で用いることができる。例えば、約10-90体積%の水と約0.5-10重量%の分散剤を含む水中油または油中水エマルジョンとして用いることができる。

放射線増感と組み合わせて放射線保護を行ってもよい。放射線保護剤は、放射線傷害から正常組織を優先的に保護するものである。放射線増感と組み合わせる場合の目的は、放射線治療剤を放射線保護剤の非存在下で使用するときに正常組織に生じ得る傷害を減らすことにある。スルフヒドリル含有剤は、一般に効果的な放射線保護剤であることが知られている。その例として、Radiation-Drug Interactions in the Treatment of Cancer (G.H.SokolとR.P.Maickel編、John Wiley and Sons., Inc.), (1980) pp113-135に記載されるJ.M.Yuhas., "On the Potential Application of Radioprotective Drugs in Solid Tumor Radiotherapy"で再検討されているアミノエチルイソチウロニウムやベータメルカプトエチルアミンのホスホロチオエート誘導体を挙げることができる。この他の放射線保護剤として、Yuhas et al., Cancer Clinical Trials., (1980), 3, 211-216にも記載されているS-2-(3-アミノプロピルアミノ)エチルホスホロチン酸がある。

この他の適当な増感剤の例として、ペルフルオロデカリン、ペルフルオロメチルデカリン、ペルフルオロアルキルシクロヘキサン(アルキルの炭素数3-5)、ペルフルオロアルキルテトラヒドロフラン(アルキルの炭素数5-7)、ペルフルオロアルキルテトラヒドロピラン(アルキルの炭素数4-6)およびペルフ

ルオロアルカン（炭素数9-11）からなる群より選択される炭素数9-11の1つ以上のペルフルオロカーボン化合物を含むフルオロカーボンエマルジョンを挙げることができる。これらのフルオロカーボンエマルジョンは、ペルフルオロ3級アルキルアミン（炭素数9-11）、ペルフルオロN-アルキルピペリジン（アルキルの炭素数4-6）およびペルフルオロN-アルキルモルホリン（アルキルの炭

素数5-7）からなる群より選択される炭素数9-11の1つ以上のペルフルオロ3級アミンを含んでいてもよい。これらのエマルジョンは、分子量約2,000-20,000の高分子量ノニオン性界面活性剤、リン脂質、炭素数8-22の脂肪酸からなる群より選択される1つ以上の脂肪酸化合物、これらの生物学的に許容される塩およびモノグリセリドをさらに含んでいてもよい。ペルフルオロ化合物と上記のペルフルオロ3級アミンの重量比は95-50対5-50である。

上で特定した増感剤は、腫瘍細胞などのターゲット部位に酸素をデリバリーするのを補強し、それによって放射線活性化合物と化学治療剤の酸素欠乏細胞に対する活性を強化することによって、これらの放射線活性化合物と化学治療剤の効力を増強する。本発明は、ターゲット部位を増大した酸素濃度下にさらす別の方法によって、プレターゲットイングプロトコルを補強することも試みている。例えば、この方法は、細胞に酸素を直接供給することによって行うことができる。例えば、酸素を発生する化合物（例えば過酸化水素）を投与するか、高圧酸素を導入することによって行うことができる。この方法は、患者をプレターゲットイングプロトコルの間に（例えば活性薬剤を含む抱合体の投与前後か投与中）高い濃度の酸素にさらす工程を必須とする。特に、酸素欠乏細胞に酸素をデリバリーすることができるようにプレターゲットイングする間または前後に、患者を高圧高酸素濃度の高圧酸素チャンバーに入れる。その結果、酸素が酸素欠乏組織に拡散し、治療用プレターゲットイングプロトコルの効果が高まる。

本発明は、光力学的治療の分野に適用することもできる。光力学的治療法は以下の2段階からなる。

ある波長の光を吸収する光増感剤をレシピエントに局所的または全身投与し、

ターゲット部位に局在化させる工程、

ターゲット細胞を適当な波長を有する光源で照射する工程

増感剤が光を吸収すると、吸収したエネルギーを組織中に溶解している酸素分子に移し、それによって活性酸素種を生成し、その活性酸素種が近くに存在する生化学物質を破壊し、したがって近傍の細胞も破壊する（増感剤がターゲット細胞に選択的に局在化しているならば、主としてターゲット細胞を破壊する）。

本発明は、以下に記載するプレターゲットティング光力学治療プロトコルを提供する。

2段階法は以下の工程を含む。

ターゲットティング部分とリガンドーアンチリガンド結合対の1員を含む第1の抱合体をレシピエントに投与する工程（第1の抱合体はターゲット部位に局在化する）、

循環する抱合体をレシピエントからクリアすることができるクリアリング剤をレシピエントに投与する任意の工程、または、循環する抱合体をレシピエントから実質的に除去する任意の代替的クリアランス工程、

増感剤とリガンドーアンチリガンド結合対の1員を含む第2の抱合体をレシピエントに投与する工程（第2の抱合体の結合対の1員は第1の抱合体の結合対の1員と相補的であり、増感剤または抱合体全体はレシピエントから迅速にクリアされるように（好ましくは腎排出されるように）化学的に修飾されている）。

上記の任意のクリアリング工程の代わりに、単に十分な時間をかけてレシピエント生来のクリアリングメカニズムを機能させ、循環している抱合体を実質的に除去してもよい。

3段階法は以下の工程を含む。

ターゲットティング部分とリガンドを含む第1の抱合体をレシピエントに投与する工程（ターゲットティング部分ーリガンド抱合体はターゲット部位に局在化する）、

レシピエントにアンチリガンドを投与する工程、

リガンドと増感剤を含む第2の抱合体をレシピエントに投与する工程（増感剤

または抱合体全体はレシピエントから迅速にクリアされるように（好ましくは腎排出されるように）化学的に修飾されており、ターゲット部位への第2の抱合体の局在化は第1の抱合体が先に局在化しているために増強されている）

上記の2段階および3段階光力学的治療法とともに、最終工程はレシピエントを適当な波長の光にさらす工程である。この工程は、増感剤包含抱合体を投与した後、約2～約72時間行うのが好ましい。

あるいは、増感剤含有抱合体をクリアする追加の工程を実施してもよい。この工程によって、増感剤の迅速なクリアランスを行ってもよい。例えば増感剤－リ

ガンド抱合体を使用するときには、アンチリガンドまたはガラクトシル化アンチリガンドを投与することによってこのクリアランス工程を行うことができる。また、例えば増感剤－アンチリガンド抱合体を使用するときには、リガンド－HSA－ガラクトースを投与することによってこのクリアランス工程を行うことができる。

ターゲット細胞を破壊するためには、増感剤はターゲット細胞に選択的に取り込まれるのが好ましい。本発明の実施において、選択的なターゲット部位への蓄積は、プレターゲットされるアンチリガンドまたはリガンドと高い親和力で結合するリガンドまたはアンチリガンドに増感剤抱合させることによって行う。投与経路も、増感剤の蓄積に影響する（例えば、動脈を通して接近可能なターゲット部位に対する動脈内投与）。

増感剤をターゲット細胞部位に一定の時間保持することも好ましい。ターゲット部位での保持はターゲッティング部分により行ってもよい（ターゲッティング部分を介して増感剤はターゲット細胞と結合している）。このとき、やがてターゲッティング部分との結合が切れて増感剤が分離するようにすることもできる。増感剤の分離法は、開裂しうるリンカーを用いるかこれに類する方法によるものとして、ターゲット細胞生化学によるもの（すなわち腫瘍細胞などの低pHを示すターゲット細胞によって低pHで溶解する増感剤をより長時間保持する）、あるいは増感剤の疎水性によるものがある（疎水性が大きくなると保持が長くなる）。

レシピエントの皮膚に隣接も密接もしていないターゲット細胞を破壊すること

を目的とし、本発明のプレターゲッティングプロトコルに用いる好適な増感剤も、比較的長い波長の光を吸収する能力を有する。光の波長が長くなれば、光は組織のより深いところまで到達することができる。このため、低波長光を吸収する増感剤に比べて、長波長光（約600-約800nm）を吸収する増感剤は、組織のより深いところに包埋しているターゲット部位に作用することができる。初期のころは光力学的治療法によって皮膚癌しか治療することができなかったが、現在では頭部、頸部、脳、肺、胃腸管および尿生殖器管の初期段階の腫瘍に適用することができるようになっている。

また、本発明の実施に使用する好適な増感剤は、高活性酸素種を効率よく生成することができる。一般に、高い疎水性を示す増感剤は、疎水性の低い増感剤に比べて、高活性酸素種をより効率よく生成することができる。このようにして効率をよくすれば、疎水性部分の細胞膜透過性が高まる関係にあるようである。

一般的な増感剤は、600-700nm（赤色光）に強い吸収バンドを有するポルフィリン誘導体である。ポルフィリン化合物に化学的修飾を施して、光力学的治療プロトコルにおけるこれらの化合物の作用を増強してもよい。アルミニウムまたは亜鉛とキレートを形成している合成ポルフィリンであるフタロシアニン（例えば、クロロアルミニウムスルホン化フタロシアニン）は、ターゲット細胞を効果的に破壊する。ポルフィリンのエーテル／エステル誘導体であるフォトフリンIIは、光力学的治療において現在最もよく使用されている増感剤である。他の増感剤の例として、クロリン（例えばクロリンe6、錫クロリンe6、バクテリオクロリンA、バクテリオクロロフィリン、モノーおよびジエーアスパルチルクロリンe6など）、ポルフィリンジエーテル（例えばジエーイソブチルエーテルおよびジヘキシルエーテル）、パープリン（例えばNT2）、ベンゾポルフィリン誘導体（例えば5,10,15,20-テトラ（ヒドロキシフェニル）ポルフィリン、テトラフェニルポルフィンのスルホン化誘導体（例えばTPPS₂（TPPS₄の誘導体であってスルホネート基を4つではなく2つ有するもの）およびTPPS₄（5,10,15,20-テトラ（4-スルホナトフェニル）-21H,23H,ポルフィン））を挙げることができる。一般に、これらの例示増感剤は、抱合化の際に有用なカルボキシレート基を有

する。

適当なスペクトル特性を有していれば、増感剤の活性化のためにいかなる光源を用いてもよい。種々のレーザー光が増感剤の活性化に使用される。レーザーをファイバーオプチックケーブルにつなげて、エネルギーをロスすることなくレシピエントに正確に光をデリバリーすることができる。その他に、化学発光も高強度の光を局所にデリバリーするために使用することができる。

さらに、レシピエントが通常の生活中に遭遇する光源（例えば直射日光）も、増感剤に活性酸素分子を生成させることができる。これは、通常の光力学的治療法のひとつの制約である。増感剤の半減期は長く、通常は約2カ月以下である。新しいベンゾポルフィリン誘導体のクリアランス期間は、約1週間である。いず

れにせよ、増感剤がクリアされる際に非ターゲット組織毒性を回避するために、適当な時間レシピエントは直射日光を避けなければならない。

本発明の増感剤とその増感剤を使用する方法を利用することによって、増感剤をターゲット細胞に特異的に蓄積し、レシピエントが直射日光を避ける必要を無くすことができるようになった。逆に言えば、本発明の増感剤とプロトコルを使用すれば、レシピエントは日光浴ができる利点を享受できる。

増感剤蓄積の動力学によってターゲッティング分子がターゲット部位にゆっくりと蓄積されて行くのを断ち、増感剤抱合体を迅速に捕獲するために高親和性のリガンド-アンチリガンド系を利用することによって、活性剤を迅速かつ特異的にターゲット部位に蓄積することができる。増感剤の循環半減期が長いとレシピエントにとってこの方法はいくぶん不便なものとなる。増感剤に化学的修飾を施して、レシピエントから迅速に排出されるようにすれば、このような不便はなくなる。増感剤を含む抱合体が迅速に排出（好ましくは腎排出）されれば、増感剤投与後数時間以内にレシピエントは通常の活動をすることができるようになる。このとき、レシピエントの系内に留まっている増感剤は実質的にすべてのターゲット部位に局在化している。次に、指定の光源をターゲットに照射した後、本質的に直ちに非ターゲット毒性の危険性を実質的に軽減しながら活性酸素を生成するのに適した波長の周囲光源にレシピエントをさらす。

増感剤はリガンドまたはアンチリガンドと公知の技術によって結合させてもよい。例えば、以下に記載するポルフィリンビオチニル化を行うこともできる。ポルフィリン誘導体のカルボン酸官能性は、ヒドロキシベンズトリアゾールとの反応によって活性化される。ビオシチンまたはビオシチン類似体をポルフィリンベンズトリアゾール活性エステルと反応させる。このときのビオシチン：ポルフィリンのモル比は約2ー約4にする。このようにして誘導化したポルフィリンは、ポルフィリン1分子あたり1ー3分子のビオチンを有する。ビオチン抱合体は、プロナーセ消化ビオチニル化ポルフィリンを使用する（ μ -ヒドロキシベンゼン）安息香酸（HABA）置換アッセイ法によって評価することができる。Journal of Biological Chemistry, 94:23C-24C, 1965参照。

本発明の化学修飾を行うことによって、増感剤を含む抱合体の迅速な排出が可能になる。このような修飾によって、増感剤を含む抱合体が腎排出されるようにするのも好ましい。適当な化学修飾は、増感剤に行ってもよいし、増感剤を含む抱合体に行ってもよい。増感剤を含む抱合体は、以下に記載されるアニオン形成剤によって処理してもよい。

有用なアニオン形成剤の例として、無水物および／または1つ以上のCOOH基を有する化合物、例えば無水琥珀酸、その他の環状酸無水物、フタル酸無水物、マレイン酸無水物、カルボキシル基で置換したN-エチルマレイミド、脂肪族系無水物（例えば無水酢酸）、芳香族系無水物、pH-可逆性無水物（例えばシトラコン酸無水物、ジメチルマレイン酸無水物）、アルファハロ酸（例えばブromoアセテート、ヨードアセテート）、チャージ修飾する分子の官能基と反応する官能基で置換した二酸または三酸を挙げることができる。

例えば、無水琥珀酸をDMSOまたは他の乾燥有機溶媒中に濃度40mg/200 μ lで溶解し、この溶液（または2.5ml以下に無水DMSOを用いて希釈したもの、 1.73×10^{-2} M）を例えば蛋白質（例えば抗体、抗体フラグメント、リガンド、アンチリガンドまたはこれらの成分の1つ以上を含む抱合体）溶液（例えば炭酸塩／重炭酸塩緩衝液中3-5mg/ml, pH8.5-9.0）に、無水琥珀酸：タンパク質のモル比1:5, 1:10または1:25で添加した。室温で反応を15-30分行って、反応完了後に琥珀酸を限外

濾過法またはゲル濾過法によって除去した。等電点電気泳動法によって、等電点の移動の程度を決定した。

チャージ修飾したリガンドとチャージ修飾したアンチリガンドの、リガンド／アンチリガンド対の相補的な1員に対する結合能は、リガンド／アンチリガンド結合親和力を試験する既知の方法によって試験する。

例えば、増感剤を含む抱合体は、生体内分布誘導分子で誘導化することによって修飾してもよい。生体内分布誘導分子の例として、親水性ポリマー、例えば10 kDデキストラン、より大きなデキストラン分子（分子量約20-約70kD）、ポリグルタメート（分子量約5-約50kD）、スクシニル化ポリリシン（分子量約5-約50kD）、所定のオリゴ糖（すなわち、化学構造が明確で、乾燥や他の器官による取り込みに実質的に勝る程度の十分なサイズを有する合成オリゴ糖であって、グロムラー濾過によって腎排出することを可能にするもの）を挙げることができる。

上述のようなポリマーは腎排出によってレシピエントから除去されるため、ポリマーによる誘導体によってポリマーを含む抱合体の腎排出を可能にすることができる。

ビオチン-ポリマー-ポルフィリン抱合体を、市販のビオチニル化リシン誘導化デキストランポリマー（例えばミズリー州セントルイスのSigma Chemical Co. 製ビオチン-デキストラン、リシンに固定可能）を用いて形成してもよい。リシン誘導化ビオチンは、リシンのε-アミノ基と例えば上記ポルフィリンのベンズトリアゾール活性化エステルとの反応によって抱合させる。本分野では、この目的のために、N-ヒドロキシスクシンイミド、ニトロ基やフッ素含有基などの強電子吸引基で置換したフェノール類などのその他の活性エステルを使用することができる。あるいは、ビオチン-ポリマー-ポルフィリン/クロリン抱合体は、リシン残基と二官能性試薬であるスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート(SMCC)との反応によって活性化した市販のビオチニル化リシン誘導化デキストランポリマーを使用して、上記ポルフィリンビオチニル化と同様の条件下（例えばpH、モル比などの条件）で形成することができる。このSMCC誘導化デキストランポリマーには、例えば5, 10, 15, 20

-テトラ- (4-ヒドロキシフェニル) ポルフィンのチオ類似体と抱合体を形成しうる反応性マレイミド官能基が含まれている。このポルフィンは、対応するp-ヒドロキシフェニルポルフィンから当分野で既知の合成法を用いて調製した。

別の誘導物として (DTPA)_n (nは約1から約2) がある。DTPAはDTPA環状無水物などのジエチレントリアミンペンタ酢酸であって、増感剤に元来存在するカルボキシル基または合成によって増感剤に導入したカルボキシル基を介してアミド結合によって結合していてもよい。

別の誘導物として、5,10,15,20-テトラ- (4-ヒドロキシフェニル) ポルフィンのヒドラジン類似体がある。これは、対応するp-ヒドロキシフェニルポルフィンからp-クロロフェニルポルフィン中間体を介して通常の合成法を用いて調製する。過ヨウ素酸塩で酸化しビオチニル化したデキストランには、ヒドラジン類似体と抱合するための反応性アルデヒド官能基が存在する。

本発明の工程では持続放出性の投与形態を採用して、増感剤をプレターゲティング法によってターゲット細胞にデリバリーすることもできる。この方法によれば、増感剤の治療効果を長期間持続させることができる。リガンドまたはアンチリガンド誘導化リポソームをこの目的で使用することもできる。例えば、Hawrotらの米国特許第4,948,590号明細書では、ストレプトアビジニル化リポソームとその中に活性薬剤を被包することが論じられている。

あるいは、クリアリング剤の使用に関する実施例IXに記載されるように、マイクロ微粒子またはナノ微粒子状のポリマー粒子の投与形態を採用することができる。この微粒子投与形態は活性剤を被包し、多くのリガンドまたはアンチリガンド分子を結合している。この方法によれば、活性薬剤はターゲット部位にリガンド-アンチリガンド結合を介してデリバリーされ、活性薬剤はその部位で長時間放出されて治療効果を持続させる。

概して、本発明の微粒子状投与形態を調製する方法は、ポリマーをホモジネートした炭化水素溶媒中に溶解して、活性薬剤溶液（好ましくは水溶液）をその中に分散し、ハロゲン化炭化水素溶媒用であってポリマー用ではない溶媒として作用する添加剤を加える工程を含む。ポリマーハロゲン化炭化水素溶液からポリマ

一が、活性薬剤含有溶液の液滴上に沈殿して、活性薬剤をエントラップする。活性薬剤は、本発明の持続放出性投与形態内に実質的に均一に分散しているのが好ましい。微粒子形成後、洗浄して有機溶媒を用いて硬化する。水洗して、水性ノニオン性界面活性剤で洗浄し、室温で減圧乾燥する。

生体適合性のため、活性薬剤がマトリックス内に分散している点に特徴がある微粒子状投与形態は、包装、貯蔵または投与前に殺菌する。殺菌は、いずれの簡便な方法で行ってもよい。例えば、微粒子にガンマ線を照射することができる。ただし、ガンマ線を照射することによって治療剤-ポリマーマトリックス内に分散した活性薬剤やそれに結合したリガンドまたはアンチリガンドの構造や機能に悪影響が及ばないという条件を満たしていなければならない。活性薬剤、リガンドまたはアンチリガンドに悪影響が及ぶときには、微粒子状投与形態は無菌状態で調製することができる。

活性薬剤は、拡散と微粒子マトリックスの侵食の両方によって、本発明の特定の投与形態から放出される。生分解速度は活性薬剤放出の動力学に直接影響を及ぼす。組成物または持続放出性投与形態の構造を変えることによって、生分解速度を調節することができる。例えば、Tice et al., "Biodegradable Controlled-Release Parenteral Systems", Pharmaceutical Technology, pp26-35, 1984に記載されるように、本発明の好ましい投与形態におけるラクチド/グリコリド比を変更すること；Kent et al., "Microencapsulation of Water Soluble Active Polypeptides" 米国特許第4,675,189号明細書に記載されるように、クエン酸や炭酸ナトリウムのようなポリマー加水分解調節剤を含ませることによって変更すること；ラクチド/グリコリドポリマー中の活性薬剤ロードを変更すること（生分解速度は含まれている活性薬剤の量に反比例する）；コアロードを変更するために異なる効力を示す一般的な活性薬剤類の適当な類似体を適切に選択すること；Beck et al., "Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide)/Norethisteron Microcapsules: An Injectable Biodegradable Contraceptive", Biol.Reprod., 28:186-195(1983)などに記載されるように粒径を変えることによって、生分解速度を調節できる。これらの生分解速度調節方法はすべてポリマー含有マトリックスの極限粘度数に影響

を及ぼすものであり、これによってマトリックスの加水分解速度が変わる。

ラクチド／グリコリド構造は、哺乳動物の生理的環境に適合しうるものであるのが好ましい。また、上記の好ましい持続放出性投与形態は、生分解して乳酸とグリコール酸を形成するが、これらは両方とも哺乳類の一般的な代謝生成物である。

微粒子に結合しているリガンドまたはアンチリガンドに必要とされる官能基は、非分解性または生分解性ポリマーユニットとともに微粒子構造中に含まれていてもよい。この目的のために利用しうる官能基として、カルボキシル基、アミノ基、スルフヒドリル基などのリガンドまたはアンチリガンドと反応しうるものを例示することができる。好ましい（ラクチド－グリコリド）ポリマー含有マトリックスなどに存在する末端カルボキシル基を、好ましい官能基の例として挙げることができる。

これらの持続放出性投与形態は、本発明を実施する際に有用な他の活性薬剤

（例えば毒素、化学治療剤、サイトカインなど）にとっても有用である。

光増感剤の効力を上げ、バースタンダー細胞を処置するために利用しうる戦略として、上記の他に、ビオチンまたはビオチン－生体内分布誘導分子と光増感剤の間に開裂可能なリンカーを使用する方法がある。開裂可能なリンカーを使用して不安定性を制御することによって、より疎水性の光増感剤を使用することができるようになるという利点がある。強い疎水性を示す光増感剤は、適当な波長の光を照射したときに大きな細胞殺傷力を示すであろう。光増感剤を含む抱合体を迅速にターゲティングしてクリアするために、生理的条件下で数時間の安定な半減期を示し（例えば約3－約12時間）、実際のな棚持ち（例えば約3カ月－約2年）をする開裂可能なリンカーを使用することができる。このような開裂可能なリンカーの例として、ジスルフィド結合、カルボキシル化エステル結合、例えばシス－アコニテート、ヒドラジド結合などを挙げるることができる。例えばHerman et al., Bioconjugate Chemistry, 4:402-405(1993)には、チオ特異的反応基を有する合成デキストリン誘導体が記載されている。このようなデキストリン誘導体を、開裂可能なジスルフィド結合を有する抱合体の形成に使用することがで

きる。ヒドラジン結合した抱合体は、PNAS, 87:4217-4221(1990)に記載される方法にしたがって形成することができる。

一価抗体フラグメント-アンチリガンドまたはリガンド抱合体は本発明のプレターゲットインプロトコルにおいて使用できる。例えば、一価抗体フラグメント-ストレプトアビジン抱合体は、ストレプトアビジンをプレターゲットするために、好ましくは本発明の2段階法のさらに別の実施態様において、使用することができる。これらの実施態様で使用し得る一価抗体フラグメントの例は、Fv、Fab、Fab'等である。約25kD(Fv)から約50kD(Fab、Fab')の範囲の分子量を典型的に示す一価抗体フラグメントは、完全抗体よりも小さく、従ってターゲット部位に浸透する能力は概して大きい。さらに一価結合の結果としてターゲット表面における結合キャリアの拘束が少ないので(二価抗体を使用した場合、二価抗体はターゲット細胞部位に強力に結合し接着するので、二価抗体がさらに浸透してターゲット組織の下層に出ることを妨害する障壁が形成される)、ターゲットイングの均質性が改善される。

さらに、分子は小さいほど速やかにレシピエントからクリアされるので、小さい分子の抱合体は投与されたときの免疫原性が小さい。一価フラグメント抱合体は完全抗体抱合体に比較して投与量のうちのターゲットに局在化する割合は少ない。しかしながら、一価フラグメント抱合体は免疫原性が小さいので、より多い量を初期用量として投与し得る。

リガンドに関しては、多価部分の投与が好ましい。この基はまた、1つまたは複数の放射性核種と結合している。その結果、多価部分は(抱合体の架橋または凝集を介して)循環中のアンチリガンド含有抱合体のクリアリング剤として機能し、またターゲットに結合した抱合体と結合することによって治療薬として機能する。上述の架橋によって生じるインターナリゼーションと対照的に、腫瘍細胞表面で生じた架橋は、一価フラグメント-アンチリガンド分子を安定させ、従ってターゲット細胞での適正な抗原密度条件下でターゲット滞留を増強する。さらに、一価抗体フラグメントは概して、二価抗体フラグメントまたは完全抗体ほどインターナリゼーションを受けない。一価抗体はインターナリゼーションを受け

難いので、一価基による架橋が可能であり、また結合した一価抗体が多点結合によって安定し得る。本発明のこの2段階プロトコルによれば、フラグメントの免疫原性が小さいので、例えばstreptavidin含有抱合体の投与量を増加でき、

より自在な用量決定が可能である。また、クリアランスと治療薬デリバリーとを同時に行うので別個に制御されるクリアリング段階が不要である。

ビオチン-アビジンまたはビオチン-streptavidinリガンド-アンチリガンド対が関与する2段階及び3段階プレターゲットティングプロトコルにおける潜在的な困難は、内因性ビオチンの存在である。ビオチンはビタミンHとしても知られ、哺乳類レシピエント中に内因性レベルで存在する。例えば、マウスは内因性ビオチンの高いレベルを有し、約マイクログラムから約ナノグラム濃度(10^{-6} ~ 10^{-9} M)の範囲である。うさぎや犬のような大型の哺乳類、うさぎの内因性ビオチンより低いレベルを示し、約低ナノグラム~約高ナノグラム濃度(10^{-9} ~ 10^{-11} M)の範囲である。ヒトはより低い内因性ビオチンレベルを示し、約低ピコグラム~約高ピコグラム濃度(10^{-12} ~ 10^{-14} M)の範囲である。内因性ビオチンレベルが日常の飲食物のような要因や経口抗生物質による腸管壁バクテリアの抑制により影響され、内因性ビオチンレベルの変化は各哺乳類種内でも観察される。

本発明の2段階及び3段階プレターゲットティングプロトコルは内因性ビオチンに係わらず実施できるが、内因性ビオチンまたはその影響を減少させる方法も有用である。内因性ビオチンの影響を減少させる1つの方法はターゲットティング部分-streptavidinまたは-アビジン抱合体の高投与量で内因性ビオチンを覆うことである。より詳しくは、内因性ビオチン及び十分なターゲット部位エピトープの両方に実質的に結合するに十分な量の抱合体を投与してレシピエントの診断または治療の利益を得る。適切な抱合体投与量の同定において、個々のレシピエントのそれぞれの内因性ビオチンレベルを決定し、それに応じて抱合体投与量を選択する。代わりに、適切な抱合体投与量はレシピエント種についての平均内因性ビオチン値に基づくこともできる。

他の方法は、レシピエントの内因性ビオチンの実質的に全てに結合するに十分

なアビジン量で前処置することを含む。この方法では、好ましくはターゲティング部分—ストレプトアビジン投与の約5分～約30分前に、アビジンは静脈内に丸薬として投与され、次いでゆっくり点滴をする（例えば、生理食塩水またはPBS中のアビジン）。代わりに、好ましくは静脈投与より早めにかつ高い投与量で、アビジンは経口投与（例えば、生卵白身として）される。さらに他の代替

法は、好ましくは静脈投与より早めにかつ高い投与量で、アビジンは浣腸により（生理食塩水中のアビジン）高投与量で投与される。

静脈内投与された薬剤は経口または浣腸経路で投与された薬剤より速やかに生体利用可能（バイオアベイラブル）になり、そのため一般に静脈内投与された薬剤は経口または浣腸経路で投与された薬剤よりより高い毒性となる。また、経口または浣腸経路で投与された薬剤の吸収、分配、動力学及び代謝は、一般に静脈内投与された薬剤より遅く、それにより、一般に経口または浣腸経路についてはより高投与量が必要である。

また、レシピエントは2段階及び3段階プレターゲティングプロトコルを行う前に、ビオチンを含まない規定食を取ることもできる。例えば、プレターゲティングプロトコルのマウスレシピエントはプレターゲティングプロトコルの始まる前約2～3日間ビオチンを含まない規定食を取ることができる。うさぎや犬のような、より大型の哺乳類は、抱合体のプレターゲティングプロトコルの第1の抱合体投与前約3～7日間ビオチンを含まない規定食を取ることができる。ヒトレシピエントはプレターゲティングプロトコルの開始前約1～2週間ビオチンを含まない規定食（例えば、卵、ナッツ、ピーナッツバター、チョコレート、キャンディー、イースト、穀物食、腎臓や肝臓のような臓器肉、肉、肉製品、マッシュルーム、バナナ、グレープフルーツ、すいか、苺、豆及び豆果のようなビオチンの飲食源を避ける）を取ることができる。この方法で、レシピエントの内因性ビオチンレベルは減少し、それにより、プレターゲティングプロトコルにおける内因性ビオチンの悪影響を削減できる。

内因性ビオチンに関する代替法は、経口非吸収性抗生物質の使用である。ほとんどのヒト内因性ビオチンは、消化管フローラ（flora）（例えば、大腸菌などの

ようなバクテリア)により生成される。可能性のある抗生物質は、消化管フローラを破壊することが知られているものである。そのような抗生物質は経口投与され、腸管から吸収されず、そのためレシピエントに非毒性である。適当な抗生物質のその他の特徴は以下の通りである。ビオチンを生成する微生物の1つ以上の種の成長及び／又は生存のアンタゴニストであること、低投与量で効果的であること等である。そのような抗生物質の例は、アンピシリン、クロラムフェニコ

ール、エリスルマイシン、オキサシリン、ナフシリン、オキシテトラサイクリン、ペニシリン-G、ペニシリン-V、テトラサイクリン、ノボビシリン、コリスチン、クロルテトラサイクリンなどである。消化管フローラにより生成されるビオチンレベルを一時的に下げるには、ゲンタマイシン、ポリミキシン-B、バンコマイシンのような経口非吸収性抗生物質をプレターゲットティングプロトコルの開始前約7～10日間投与できる。

前記方法の組み合わせも本発明の実施に使用できる。上記方法の全てが2段階プレターゲットティングと組み合わせて使用できる。

本発明のプレターゲットティング方法の別の実施態様では、リガンド-またはアンチリガンド-活性薬剤の投与経路が関与する。本発明のこれらの実施態様では、ターゲット含有組織に対する供給動脈を利用して活性薬剤-リガンド(例えば放射性標識ビオチン)または-アンチリガンドを動脈内投与する。例えば放射性標識ビオチンの場合、アビジン-ビオチン相互作用によって高い抽出効率を得られるので、放射能の比活性レベルが高いならば、極めて高いレベルの放射能をターゲット細胞に容易にデリバリーできる。従って、デリバリーされる放射能の量の上限は、ターゲットにおけるビオチン結合能力(即ち、ターゲットでの抗体の量及び該抗体に結合したアビジンの当量)である。

本発明のプレターゲットティング方法のこれらの実施態様においては、元素変換プロセスから生じる(非放射性担体形態が存在しない)治療用核種放出粒子が好ましい。放射性核種の例は、Y-90、Re-188、At-211、Bi-212等である。リアクターから産生される他の放射性核種も、治療有効量の放射線をターゲットにデリバリーする量を結合できるならば本発明のこれらの実施態様の実施に有用である。放射

線の治療有効量は、核医学の実務者に公知の複数の要因にもよるが、約1500～約10,000cGyの範囲である。

治療的プレターゲティング法において、本発明の活性薬剤包合体を投与する場合、該活性薬剤含有包合体は、好ましくは、必要な治療量の活性部分が提供され、ターゲット部位、例えば腫瘍に到達するが、通常の組織に対して不適当な毒性にならない量で投与される。そのような毒性は、特定の活性薬剤が細胞障害性薬剤、例えば放射性材料または細胞毒素である場合に、起こり得る問題である。

包合体を含有する活性薬剤の好ましい投与量及び投与領域は、特に、治療を受ける患者の状態、治療すべき特定の疾病、活性薬剤が単独で投与されるか又は他の治療と組み合わせて行われるか、活性薬剤のin vivoでの半減期、その通常の組織、例えば腎臓及び肝臓に対する影響のようなファクターに依存するであろう。例えば、包合体は、単一の投薬、例えばボラス(bolus)、複数に分かれた投薬により投与され、または連続的に、例えば静脈内輸液により投与され得る。

適する投薬及び投薬計画は、当該分野の技術者により決定され得る。しかしながら、いくつかの投薬計画が、一定の固有の効果を与え得ることが予想される。例えば、分割投薬(divided dosage)の投与、例えば活性薬剤包合体の有効な投与量を2～5に分割した投薬が有利であり得る。そのような分割投薬は、より良好で、より効率の良い活性薬剤、例えば放射性材料または細胞毒素のターゲット部位へのデリバリーを可能にする。これは、いくつかの場合には、1回の投薬では、ターゲット部位にプレターゲティングされた包合体に含有される全てのリガンド又はアンチリガンド結合部位、例えばビオチン結合部位の所望の飽和を提供するのに有効でないか、または望ましくないからである。飽和を、一回のより高い投与量の投薬により達成することもできるが、これは、活性薬剤の通常タイプへの非特異結合のポテンシャルを増強し得るため不利であろう。また、これにより、循環系内の活性薬剤のレベルが高くなるため、ターゲット部位に特異的に結合せず、通常の組織に結合して通常の組織の損傷を引き起こす危険性が高くなるであろう。

これに対して、そのような毒性は、同量の活性薬剤をより長い時間をかけて投

与するシングルユニタリー(single unitary)投与よりも、分割投薬の投与により緩和される可能性が高い。分割投薬の使用は、非ターゲット組織の細胞毒性、例えば肝臓または心臓の損傷の可能性を減少させる。また、活性薬剤のより効率的なデリバリー、並びにプレターゲッティングされた包合体、例えばアビジンまたはストレプトアビジン含有包合体に含まれるリガンドまたはアンチリガンド結合部位のより良好な飽和を可能にする。

そのような分割投薬は、所望の飽和レベル及び治療効果を達成する投薬及び投薬計画で投与されるであろう。当然ながら、これは、ターゲッティングされる治療包合体に含まれる特定の活性薬剤に依存する。例えば、治療有効量が $500\mu\text{g}$ ボーラス(bolus)である場合、分割投薬計画は、代わりに、例えば2回の $250\mu\text{g}$ 投薬、3回の $166\mu\text{g}$ 投薬、4回の $125\mu\text{g}$ 投薬、5回の $100\mu\text{g}$ 投薬を含むであろう。そのような投薬の間隔は、上記で列挙したファクター、特に、例えば特定の活性薬剤、そのin vivo 半減期、クリアランス速度に依存して変化するであろう。一般的には、約2～12時間、好ましくは2～8時間、より好ましくは3～5時間の範囲であろう。

また、輸液を介しての治療用包合体の投与も、治療プレターゲッティングプロトコルにおいて有利であると考えられる。例えば、一定の低投与量の活性薬剤の投与が可能になり、これにより活性薬剤のターゲット部位への望ましいデリバリーが提供されるが、患者の循環系に含まれる特定の活性薬剤包合体の平均濃度がより低いため、非特異的結合に対する力価(potential)は減少する。一般的に、有効な輸液速度は、約 $10\mu\text{g}/\text{時間}$ ～約 $100\mu\text{g}/\text{時間}$ であろう。

しかし、当然ながら、これは、特定の活性薬剤、治療すべき疾病、患者の状態、治療計画(例えば、プレターゲッティングプロトコルと組み合わせて、他の治療を用いるか否か)等に依存するであろう。最適な輸液速度の決定は、当該分野の技術者により行われるであろう。特に、上記分割投薬及び継続的な輸液は、放射性材料及び他の細胞毒素、例えばY-90-DOTA-ビオチン包合体の投与を含む治療的プレターゲッティング法に有利であろう。

動脈内投与プレターゲッティングを、サプライ動脈(supply arteries)が出入

りできる器官または組織に存在するターゲットに適用することができる。本発明のプレターゲッティングの動脈内デリバリーアспектについての適用例には、肝動脈投与による肝臓癌の治療、頸動脈投与による脳の早期癌(brain primary tumors)及び転移の治療、気管支動脈投与による肺癌の治療、及び腎動脈投与による腎臓癌の治療が含まれる。動脈内投与プレターゲッティングは、下記で論じるように化学療法薬、毒素及び抗癌活性薬剤を用いて行うことができる。力価の高い薬物、リンホカイン、例えばIL-2及び腫瘍壊死因子、 γ -インターフェロン、薬物／リンホカイン-担体-ビオチン分子、ビオチン化薬物(biotinylated

drugs)／リンホカイン、及び薬物／リンホカイン／毒素を付したビオチン誘導リポゾーム(toxin-loaded, biotin-derivatized liposomes)は、本発明のこの実施態様の実施において、活性薬剤及び／またはそれらのデリバリーに有用な剤形の例である。

放射性治療薬剤を使用する本発明の実施態様においては、ターゲットティングされなかった(non-targeted)薬剤の急速なクリアランスは、非ターゲット器官、例えば骨髄の治療薬剤被曝を減少させる。従って、より高い投与量の放射線を、投与量を制限する骨髄毒性なしに投与できる。さらに、本発明のプレターゲッティング法は、所望により短期投与の骨髄保護剤、例えばWR2721、並びに他の保護剤、例えばIL-3、GM-CSF、G-CSFまたはIL-3とGM-CSFとの組み合わせの投与を含む。その結果、より高い投与量の放射線でも、投与量を制限する骨髄毒性なしに与え得る。

また、プレターゲッティング技術は、通常、リガンド-アンチリガンド対のメンバー間の高い親和性結合のため、活性薬剤が比較的速くターゲット部位へ沈着(accretion)することを特徴とする。例えば、活性薬剤の沈着は、活性薬剤含有包合体の投与から約1～8時間以内に治療的または診断的に有効なレベルに達する。従って、好適な短い半減期を有する放射性核種を本発明のプレターゲッティングプロトコルに使用することができる。この方法により、非ターゲット毒性はさらに減少する。短い半減期を有する放射性核種の例には、Cu-64、Cu-67、Lu-177、Rh-105、I-123、I-131、Sm-153、Re-186、Re-188、Bi-212、Pb-212、At-211

、Y-90、In-111、Tc-99m等が含まれる。

上記で説明したプレターゲッティングプロトコルは、まず放射性核種診断または治療部分(moiety)と組み合わせて記載したが、該プロトコルは、他の部分、例えば抗癌剤、化学療法薬等のデリバリーへの使用にも適する。例えば、最も自然に生じる及び組み換えサイトカインは、短いin vivo 半減期を有する。この特徴は、しばしば殆ど有毒な投与量が必要となるため、これらの分子の臨床的有効性を制限する。ヒトにおいて、投与量を制限する毒性は、例えば高い投与量のIL-2または腫瘍壊死因子、γ-インターフェロンまたはリンボトキシンの投与に見られてきた。

抗癌剤、例えばIL-2及びTNFを、本発明の2段階または3段階プレターゲッティングプロトコルの実施における活性薬剤として使用することもできる。いくつかの抗癌剤は、短い循環半減期（投与後約1時間未満）を示す。例えばIL-2（約10分間の半減期）、他のインターロイキン、TNF、インターフェロン等である。そのような短い半減期を有する活性薬剤は、本発明のプレターゲッティングプロトコルに使用するのに適している。

より長い半減期（投与後約2～約12時間の範囲）を有する抗癌剤は、好ましくは低い投与量で使用されるが、そのような部分を高い投与量で組み込んだ包合体は、包合体、活性薬剤及びそれらの代謝物の腎臓排出への生体分布を導くために、生体分布指向部分、例えばポリマーも組み込んでいるのが好ましい。しかしながら、長い半減期の抗癌剤のリガンドまたはアンチリガンド誘導體化により、包合体を高い投与量で投与することを可能にするのに十分な程度に、血清半減期を減少させてもよい。

IL-2は、15,500ダルトンの分子量を有し、133のアミノ酸（42%の非極性及び58%の極性）から形成される。IL-2は、リガンドまたはアンチリガンド（例えばビオチンまたはストレプトアビジン）との、または生体分布指向部分（例えばポリマー）の官能基との反応のための12の遊離第一アミンを特徴とする。一つのジスルフィドCys58-Cys105が活性に必須であると考えられる。Cys125残基はいくつかの用途においては要求されず、誘導體化のための追加の官能基を提供すると考

えられる。IL-2の三次元結晶構造は、3オングストロームの解像度で解析されている。二次構造の大部分は、天然には α 螺旋である。三つの α 螺旋(残基11-19; 残基33-56;及び残基107-113)がIL-2の結合及び活性に重要であると考えられる。12の遊離アミンのうち5つが、これらの螺旋内にあり、好ましくは、IL-2の誘導体化は、これらのアミンを介しては行われぬ。IL-2は、通常、モノ-S及び逆相高圧液体クロマトグラフィー(RP)により精製される。RPの溶出条件(60% アセトニトリル, pH 2-3)は、非常に安定であるか、または少なくともエラスティック(elastic)な分子を提案する。従って、IL-2は多くの包合技術に適すると考えられる。

IL-2-ビオチン包合体は、ビオチンアミドカプロエート N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(Sigma Chemical Co.により市販されている)を用いて形成しうる。IL-2及びビオチンアミドカプロエート N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの反応は、IL-2を溶液中に維持するために、0.1%のドデシル硫酸ナトリウムを含有する0.1Mのホウ酸ナトリウム緩衝液, pH8.0-8.5中、室温で、0.5 時間行われる。IL-2の濃度が反応緩衝液中、5-10mg/ml のとき、イミデートエステルが総反応容量の5%-10% 以下の量でDMSO中に溶解され、ビオチン:IL-2 のモル比2-4で添加されるとき、ビオチンは、75-80 % 取り込まれる。生成した包合体は、IL-2分子当たり1.5 - 3のビオチンを含む。ビオチンの導入は、2-(4- ヒドロキシアゾベンゼン)安息香酸を用いて評価される(プロナーゼ消化ビオチン化IL-2を用いたHABA置換アッセイ)。

ポリマー-IL-2-ビオチン包合体は、リシン残基と二官能性試薬SMCCとを上記で説明したIL-2のビオチン化と同様の条件下(例えばモル比等)で反応させることにより活性化された、市販のビオチン化リシン-誘導デキストランポリマー(Sigma Chemical Co.)を用いて形成され得る。これにより、SMCC誘導デキストランポリマーは、酢酸/リン酸塩緩衝液中pH5-7 のIL-2のシステインスルフヒドリル部分と包合可能な反応性マレイミド官能基を含む。

IL-2レセプターを有する細胞には、活性化されたT細胞、通常のT細胞、活性化されたB細胞、NK細胞、LAK細胞及び胸腺細胞が含まれる。高い、中程度

の、及び低い親和性のIL-2レセプターが存在する。しかしながら、IL-2レセプターの約10%のみが高い親和性(K_d 約 10^{-11} M)のレセプターである。

本発明の2段階プレターゲットティングアспектの実施において、IL-2は下記のようにターゲット細胞にデリバリーされ得る。

ターゲットティング部分及びリガンド／アンチリガンド結合対の一員を含む第1の包合体がレシピエントに投与される。該第1の包合体はターゲット部位に局在する；

所望により、循環する包合体のレシピエントからのクリアランスを導くことのできるクリアリング剤をレシピエントに投与し、または所望によりレシピエントをクリアリング装置または別のクリアリング法で処置して、循環する包合体をレシピエントから実質的に除去する；そして

IL-2のような抗癌剤及びリガンド／アンチリガンド結合対の一員を含む第2の包合体をレシピエントに投与する。該第2の包合体結合対の一員は、第1の包合体のものと相補的である。

上記で説明した所望によるクリアランス段階の他の例は、単に、レシピエントの本来のクリアランス機構により循環する包合体が実質的に除去されるのに十分な時間放置することである。

活性化された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を維持するのに、及び他の形態の癌治療のために有効なIL-2の濃度は、レシピエントに有毒であることが判明している。IL-2の腫瘍マイクロ環境への局在化は、エフェクター細胞を、免疫原性に乏しい腫瘍抗原に対して局所的に活性化することを可能にする。細胞毒性Tリンパ球系及びTヘルパー系のエフェクター細胞は、腫瘍抗原を認識するように誘導され、他の位置への癌の転移を捜し出すようにクローン的に(clonally)広がる。

さらに、B細胞は、腫瘍抗原を特異的に認識する抗体を分泌する。これらのB細胞は、IgG分泌細胞及び記憶細胞(memory cell)に成熟し、腫瘍抗原が他の部位で検出されるまで広がり続ける。さらに、ナチュラルキラー細胞は、IL-2によって活性化されるため、抗癌免疫の候補となる。T細胞及びB細胞を有しないがNKコンピテントなSCID-ベージュ(beige)マウスについての研究により、そ

のようなマウスがIL-2トランスフェクト腫瘍細胞系を有効に拒絶する宿主であることが見出された。Alosco et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 36: 364-372, 1993参照。

腫瘍壊死因子(TNFs)は、種々の哺乳類から単離されている。例えば、ヒト、マウス、ウサギ、モルモットは、少なくとも α 及び β 型のTNFを示す。ヒトにおいては、TNF α は、分子量が45(ゲル濾過)及び17(SDS-PAGE)であり、等電点が5.6であり、グリコシル化がなく、プロテアーゼ感受性であり、2個のシステイン残基、157個のアミノ酸及び末端バリン残基を有する。TNF β は、分子量が65(ゲル濾過)及び25(SDS-PAGE)であり、等電点が5.8であり、グリコシル化があり、プロテアーゼ抵抗性であり、システイン残基がなく、171個のアミノ酸及び末端ロイシン残基を有する。TNF α 及びTNF β の血清半減期は、約10～15分間である。

TNF α 及びTNF β は、リガンドビオチン、または生体分布誘導分子の官能基との包含のための遊離の第一アミンを示す。TNF-ビオチン包含体は、下記のように形成され得る：ビオチンアミドカプロエートN-ヒドロキシスクシンイミデート(少量のDMSOに溶解)をビオチン:TNFのモル比4-8で、TNF(0.1M 硼酸塩緩衝液に溶解, pH8.0-8.5, タンパク質濃度0.5mg/ml)について提供する。室温で2時間経過後、TNFが、TNF 1分子有り1分子のビオチンを取り込んだことがHABAアッセーにより確認された。

ポリマー-TNF-ビオチン包含体は、市販されているビオチン化リシン誘導デキストランポリマー(Sigma Chemical Co.により提供されている10kD-70kD グルカンポリマー)を用い、これをN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジル-ジチオ)プロピオネート(SPDP)と上記のTNFのビオチン化と同様の条件下で反応させ、ピリジルジチオ誘導化ポリマーを得ることにより形成しうる。TNFは、そのリシン残基により、二官能性試薬SMCCを用いて、上記で説明したTNFのビオチン化と同様の条件下で誘導され、マレイミジル誘導化TNFを生じる。ピリジルジチオポリマーに、酸素のない環境下で、DTT;ポリマーのモル比2:1でジチオスレイトール(DTT)を加え、遊離のスルフヒドリル部分をポリマー上に生じさせる。酸素のない

い環境下で誘導化されたポリマーを精製した後、マレイミジル誘導化TNF を添加する。このマレイミジル基が誘導化されたポリマーのスルフヒドリル部分と反応して、包合体生成物を生じる。

TNF レセプターを有する細胞には、脂肪細胞、管状筋細胞、子宮癌、胎児の肺、膀胱癌、組織球性白血病、赤白血病、前骨髄球性白血病、扁平上皮癌、子宮癌、Tリンパ腫、ヒトリンパ球、リンパ芽球性白血病（二つのレセプター）、単球性白血病、包皮線維芽細胞、結合組織（二つのレセプター）、マウスマクロファージ及びウシ内皮が含まれる。高い、中程度の及び低い親和性のTNF レセプターが存在する。

TNF α 及びTNF β が、特定のターゲット細胞に対して異なる生物学的効果を示すこと見出された、例えば、内皮細胞（IL-1の製造）、骨髄細胞（クロノゲニックサバイバル(clonogenic survival)）、線維芽細胞及びマクロファージ（マクロファージコロニー刺激因子の生産）、好中球（好中球の活性化）、骨芽細胞

（Ca²⁺コラーゲンデグラデーション(collagen degradation)の増殖、放出）、血管平滑筋細胞（ヒトリンパ球抗原-DR のインターフェロナー γ 依存性発現）、T細胞ハイブリドーマ（MHC-I 細胞発現）、及びBリンパ球（成長因子）である。

本発明の2段階プレターゲットティングアспектの実施において、TNF は、本質的にIL-2について上記で説明した方法により、ターゲット細胞にデリバリーされる。

TNF 自体は、腫瘍細胞の狭いスペクトルで細胞毒性であるが、このサイトカインは、広範囲の免疫調節作用を示す。そのような作用の一つは、腫瘍浸潤マクロファージまたは単球の活性化であり、これによりマクロファージを抗癌性にする。この点におけるTNF のメカニズムに関する一つの理論は、TNF が単球を刺激して、逆にTNF により刺激されて細胞毒性ファクター（例えば、酸化的バースト、プロテアーゼ分泌またはサイトカイン放出）を放出するマクロファージを増強する。TNF 放出抗癌作用は、オートクリンメカニズムを介して維持または誘導し得る。他のサイトカイン（例えば、 γ -インターフェロン）により単球またはマクロファージをさらに活性化することにより、細胞毒性効果を増強してもよい。

例えば、 γ -インターフェロン活性化単球からの膜の標本は、K562（赤白血病細胞系）またはWEHI164（マウス線維肉腫細胞系）ターゲット細胞に対して細胞毒性がある。単球を組み換えTNF- α で1時間前処理し、続いて培地単独でまたは γ -インターフェロンで処理すると、TNF- α / γ インターフェロン処理膜標本による上記腫瘍細胞型の壊死率が増加する。Peck et al., Cellular Immunol., **132**: 308, 1991参照）。

Burrows et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**: 8996-9000, 1993 では、血管ターゲッティングの概念が論じられている。腫瘍ターゲット血管内皮は、循環する薬剤に導入され得る。Burrows et al.は神経芽細胞系を、マウスのINF- γ 遺伝子でトランスフェクトした。これらのトランスフェクトされた細胞並びにそれらのトランスフェクトされていないカウンターパートは、BALB/c nu/nuマウスの皮下で成長する。このトランスフェクトされた細胞は、INF- γ を分泌し、これは、腫瘍マス内での毛細血管及び細静脈の内皮細胞による、主な組織適合性複合体のクラスII抗原の発現を誘導した。その後、そのようなMHC クラスII抗原をターゲットとした免疫毒素を投与すると、腫瘍及び腫瘍退縮物(regressions)に対する急速な沈着が観察された。処置後7～10日に再発が観察された。これは、腫瘍外血液供給から栄養を誘導する生存腫瘍細胞のためである。

プレターゲッティング法は血管ターゲッティング診断または治療プロトコルの実施に使用しうる。例えば、血管ターゲッティングの実施に有用な適する2段階プレターゲッティング法は下記のものを含む。

腫瘍内皮細胞に特異的なターゲッティング部分及びINF- γ を含む第1の包合体をレシピエントに投与する。この第1の包合体は、ターゲット部位に局在し、INF- γ は腫瘍内皮細胞によるMHC クラスII抗原の発現を誘導する；

所望により、循環する包合体のレシピエントからのクリアランスを導くことのできるクリアリング剤をレシピエントに投与し、または所望によりレシピエントをクリアリング装置または別のクリアリング法で処置して、循環する包合体をレシピエントから実質的に除去する；そして

抗癌剤、例えば毒素、放射性核種、抗癌剤等、並びにMHC クラスII抗原に特異

的なターゲッティング薬剤を含む第2の包含体をレシピエントに投与する。

血管ターゲッティングに有用な別の2段階プレターゲッティング法を下記に示す：

腫瘍内皮細胞に特異的なターゲッティング部分及びリガンド－アンチリガンド結合対を含む第1の包含体をレシピエントに投与する。この第1の包含体は、ターゲット部位に局在する；

所望により、循環する包含体のレシピエントからのクリアランスを導くことのできるクリアリング剤をレシピエントに投与し、または所望によりレシピエントをクリアリング装置または別のクリアリング法で処置して、循環する包含体をレシピエントから実質的に除去する；そして

抗癌剤、例えば毒素、放射性核種、抗癌剤等、並びにリガンド／アンチリガンド結合対の一員を含む第2の包含体をレシピエントに投与する。この第2の包含体結合対の一員は、第1の包含体のものと相補的である。

この後者のプロトコルは、腫瘍内皮細胞に依存せずに活性薬剤を有する包含体により認識される抗原を発現し、且つレシピエントを全身投与されたINF- γ に

晒さないという利点を提供する。

上記で説明した所望によるクリアランス段階の他の例は、単に、レシピエントの本来のクリアランス機構により循環する包含体を実質的に除去されるのに十分な時間放置することである。

さらに、所望による追加の工程は、腫瘍細胞に特異的なターゲッティング部分及び細胞毒性活性薬剤を含む複合体の投与である。さもないと、腫瘍細胞に特異的なターゲッティング部分を含む複合体及び第1の包含体に取り込まれたリガンド／アンチリガンド結合対の一員を含む包含体の投与である。この包含体は、ターゲット部位に局在する。この方法において、腫瘍外血管から栄養を受ける腫瘍細胞がアドレス(addressed)される。

本発明は、ストレプトアビジンターゲッティング部分包含体の投与、及びそれに続くビオチン化サイトカインの投与のようなプロトコルも意図している。そのようなアンチリガンドのプレターゲッティングは、ターゲット細胞に局在化する

サイトカインの量を増加させることにより、サイトカイン治療の効力を改良する。

ストレプトアビジン-抗体包含体は、通常、本来の抗体と同様の薬物動態学を示し、それらの構造に依存して、良好にターゲット細胞に局在する。ビオチン化サイトカインは、短いin vivo 半減期を有するが、サイトカインは、ビオチンのアビジンに対する親和性の結果としてターゲットに局在化し得る。さらに、ビオチン-アビジンは、pH依存性解離を行う。これは、遅い速度で起こり、これにより、サイトカインがターゲット部位において比較的継続的に時間をかけて持続的に放出することが可能になる。また、ビオチン-アビジンアソシエーションを介してターゲット細胞に結合したサイトカインは、抽出及び細胞媒介細胞毒性に影響される細胞によるインターナリゼーションが可能である。

予め形成された抗体-ストレプトアビジン-ビオチン-サイトカイン製剤も、本発明のこれらの方法の実施に使用され得る。さらに、本発明の3段階プロトコルも、IL-2のようなサイトカインのターゲット部位へのデリバリーに使用される。

本発明の別の目的は、サイトカイン（リガンドまたはアンチリガンド）包含体のターゲット部位、例えば腫瘍における利用を増加することにある。より詳しく

は、本発明の目的は、サイトカインの腫瘍細胞へのデリバリーのためのデリバリーシステムとしてのTNF-ビオチン／（ストレプトアビジンまたはアビジン）-抗体包含体システムの利用を増加することにある。これは、該部位に、生物学的に活性な、“遊離”サイトカイン、例えばTNF のターゲット部位における特定の放出を提供することにより達成される。

これは、ターゲッティング部位-（リガンドまたはアンチリガンド）包含体、及びサイトカイン（リガンドまたはアンチリガンド）包含体、またはそのような複合体の形成を提供する部分の投与により行われる。典型的な態様は、予めビオチン化TNF と複合化されたNR-LU-10/ ストレプトアビジンの複合体の投与を含む。この“プリメード(premade)”融合構築物は、サイトカイン、例えばTNF の腫瘍部位への部位特異的デリバリーに有効な手段である。さらに、これは、TNF に

関連する全身性毒性を減少しうると信じられている。

この点において、腫瘍壊死因子(TNF)を含むサイトカインの利用は、その全身性毒性と作用が望まれる部位への有効なターゲッティングの欠如の両方により制限されていた。この出願は、サイトカインのターゲット部位への部位特異的デリバリーを有効にするプレターゲッティングを利用する方法を記載する。プレターゲッティングされた(別々に投与された)及びプレコンプレックスされた(Ab-St rAv(Bt-サイトカイン))の両方に適用され得る別の方法は、上記の技術のいずれによってもターゲット部位へのサイトカインの局在化に続くターゲット部位での生物学的により有効な“遊離の”サイトカイン、例えばTNFの放出を提供するであろう。TNFは、細菌性のエンドトキシン及び他の薬剤による刺激に応答して、単球食細胞により合成され分泌されるタンパク質である。これは、*in vivo*で腫瘍の出血性壊死を生じさせることが示されている。TNFのターゲット部位へのデリバリーは、その短い半減期(ヒトにおいて11-30分)及びその心血管系に対する毒性のため困難であり、低血圧が投与量を制限する。この低血圧は、敗血性ショックに見られるように、血管内皮細胞による硝酸のTNF媒介放出の結果である可能性が高い。プレターゲッティングは、比較的短い血清半減期を有する分子を腫瘍に“トラッピング”し、短時間で高濃度に沈着させるのに有効な方法であることが示されている。これらの分子は、腫瘍からの抗体-ストレプトアビジン包

合体の排出速度及び/または拡散が遅いために、長期間保持される。

従って、TNFはその血管に対する作用により毒性であるため、同じ毒性が、プレターゲッティング法におけるビオチン化TNF(TNF-Bt)にも予想される。これは、この材料の非常に遅い浸潤によりアドレスされるが、なお、一定濃度のTNFに血管が晒されている可能性がある。従って、本発明の目的は、TNF-Btを抗体/St rAvとプレコンプレックス化することによりこの毒性を“マスク”し、これにより、ターゲット部位における沈着を薬物動態学的な意味で抗体依存性とするところにある。この構造が毒性がないまたは低いことを考えると、ターゲット細胞に対する有効性がより低い可能性がある。この場合、“遊離の”生物学的に活性な包含合体をターゲット部位で放出させるためには、TN-Bt包含合体をターゲット部位で

ピークレベルに沈着させ、その後、TNF-Btと入れ代わってこれをAb-StrAvから放出させ、Ab-StrAvから放出する平衡を壊し、“遊離の”TNF-Btの濃度を上昇させるように作用するビオチンまたは非毒性の小分子のビオチン化種を全身投与することができる。TNFは分子量約16kDのタンパク質であるため、腫瘍から急速には拡散しない。従って、有効な局所濃度が達成される。

本発明のこの実施態様についての思想は、StrAvの非共有包合体及びビオチン化NR-Lu-10が、高濃度の遊離のビオチンの存在下、非常に速い速度（一日未満）で解離したが、ビオチンの不存在下ではよりはるかに遅い速度で解離したことを示すin vivo 実験データである。この結果は、1“パルス”のビオチンの投与により、ターゲット局在化に続く治療種の“オフローディング(offloading)”が可能になるという証拠を示す。

遊離のビオチンの投与が血清ビオチンレベルを対応して増加させ、遊離のサイトカインの解離を促進することが信じられている。しかしながら、十分な濃度のビオチンがビオチン投与によっては達成され得ないことを考えると（なぜならin vivo ではビオチンは厳重に調節されているからである。）、低分子、タンパク質またはポリマーのようなビオチン化種を適当な薬物動態学により投与することにより、この潜在的な問題を未然に防ぐことができるであろう。

従って、上記に基づき、本発明のこの実施態様は、本質的に、プレターゲットティングされているかプレコンプレックス化されているかにかかわらず、TNF-Btと

サイトカインーリガンドまたはアンチリガンドとの非共有性、例えばターゲット部位における相互作用を利用し、それをリガンドまたはアンチリガンド、例えばビオチンと競合させることにより放出を促進させることを含む。この実施態様の別の改良は、さらに、リガンドまたはアンチリガンドビオチンの適当な低親和性類似物を使用して遊離のサイトカイン、例えばTNFを放出させることを含む。

本発明のプレターゲットティング技術に従ってデリバリーされ得る他の抗癌剤は、セレクトイン(selectin)、例えばL-セレクトイン、P-セレクトイン及びE-セレクトインである。サイトカインの存在は、内皮細胞のような細胞を刺激し、それらの表面にセレクトインを発現させる。セレクトインは、白血球に結合し、必要とされる場

所に白血球をデリバリーするのを助ける。従って、ストレプトアビジン—またはアビジン—ターゲッティング部分包合体の投与、及びそれに続くビオチン化セレクチンの投与のようなプロトコルも本発明により意図されている。そのようなアンチリガンドプレターゲッティングは、ターゲット細胞に局在するセレクチンの量を増加させることによりセレクチン治療の効力の改善に寄与する。この方法において、セレクチン発現のサイトカイン誘導の必要性は、ターゲット細胞集団におけるセレクチンの局在化及び保持により未然に解決される。

化学療法薬も、通常、治療有効量において短いin vivo 半減期を示す。従って、本発明のプロトコルの別の実施例は、アビジンターゲッティング部分包合体の投与と、それに続くビオチン—化学療法薬包合体または複合体、例えば薬剤—担体—ビオチン複合体の投与を含む。本発明の3段階プロトコルは、化学療法薬、例えばメトトレキセート、アドリアマイシン、力価の高いアドリアマイシン類似物、トリコテセン(trichothecenes)、力価の高いエネダイン(enediynes)、例えばエスペラマイシン(esperamycins)、及びカリケアマイシン(callicheamycins)、チトキサラン(cytosan)、ビンカアルカロイド、アクチナマイシン(actinomycin)D、タキソール、タキソテレ(taxotere)等のターゲット部位へのデリバリーにも使用され得る。

上記で説明したプレターゲッティングプロトコルの例の大部分は、癌の治療に関するが、プレターゲッティングプロトコルは、他の疾患の診断及び治療にも使用され得る。他の疾患の例を以下に論じる。

例えば、活性化された細胞毒性T細胞に対する細胞毒性を有する活性薬剤、例えばトリコテセン(例えば、ロリジンA(Roridin A)、ベルカリンA(Verrucaridin A)、アングイジン(anguidine)、スチルペネトリオール(scirpenetriol)等)、並びにヘルパーT細胞の活性またはヘルパーT細胞の数を減少させる薬剤、例えばTGF- β 、またはTs活性を増加させる薬剤等は自己免疫疾患の治療及び移植の拒絶反応の防止を促進させるであろう。自己免疫疾患の組織疾患は、活性化された細胞毒性T細胞の直接作用により起こる。組織移植も、一部、新しい組織の細胞に結合して、これを溶解する活性化されたT細胞の作用により媒介される

。活性化された細胞毒性T細胞を選択的に脱活性化するかまたは選択的に殺す活性薬剤は、自己免疫疾患の治療または組織拒絶反応の防止において用いられる本発明のプレターゲットティングプロトコルにおいて活性薬剤として使用しうる。そのような活性薬剤は、抗体（ヘルパーT細胞及びIL-2の協力によりB細胞により産生される）-移植片拒絶反応に関連する細胞溶解を媒介する補体を破壊する第2の活性薬剤と組み合わせて投与することもできる。

ターゲット組織へのターゲットティングは、抗-TAC、抗-IL-2レセプター抗体（例えば抗-P-55レセプター及び抗-P-75レセプター）のようなIL-2レセプターに関する抗体を介して、またはIL-2自体により、またはそのような方法により行われる。IL-2は、そのレセプターに結合して急速にインターナリゼートされ、さもないと大部分腎経路で排泄される。従って、IL-2は、ターゲット細胞の表面に、プロトコルを完了するのに十分なだけ長くは残存しないので、プレターゲットティングにはあまり望ましくないターゲットティング部分である。

例えば、活性薬剤、例えばインターフェロン- γ 、腫瘍壊死因子- α またはそれらの組み合わせを、単球またはマクロファージまたは腫瘍細胞にプレターゲットティングプロトコルによりデリバリーすると、単球を活性化して細胞毒性マクロファージにするメカニズムにより癌の治療を促進させる。活性化されたマクロファージは、酵素、リゾチームカテプシン及び加水分解酵素のような毒性部分を排

除する。腫瘍壊死因子 α は細胞毒性マクロファージの活性化により作用し、腫瘍細胞を直接殺すか、または腫瘍細胞をエフェクター細胞が媒介する細胞毒性に影響されやすくする。二つの活性薬剤の組み合わせによりマクロファージの殺腫瘍活性が最適に開始される。ターゲット組織のターゲットティングは、腫瘍特異抗原に関連する抗体により、局在化した環境で活性薬剤が浸潤性単球集団に与えられるように行われる。

例えば、インターロイキン-2のような活性薬剤の、プレターゲットティングプロトコルによる細胞毒性T細胞へのデリバリングは、腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)の活性化のメカニズムにより癌の治療を促進するであろう。細胞毒性T細胞によるキリング(killing)は、ターゲット細胞の膜に入りターゲット細胞の溶解を促

進する孔形成部分の放出により媒介されると信じられている。ターゲット組織へのターゲッティングは、腫瘍特異的抗原に関する抗体により行われ得る。

例えば、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)のような活性薬剤の、マクロファージ及び多核好中球へのプレターゲッティングプロトコルによるデリバリーは、浸潤性単球及び多核白血球(PMNs)の活性化のメカニズムにより癌の治療を促進するであろう。単球及び多核白血球によるキリング(killing)は、これらの細胞の活性型により放出される細胞毒性酵素の結果である。ターゲット組織へのターゲッティングは、腫瘍特異的抗原に関する抗体により行われ得る。

例えば、トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β)のような活性薬剤の、プレターゲッティングプロトコルによる膵臓組織へのデリバリーは、細胞毒性T細胞の成熟の抑制及びT細胞の増殖の抑制のメカニズムによりインシュリン依存型糖尿病の治療を促進するであろう。膵臓組織へのデリバリーは、例えば島細胞に存在する抗体または抗原を認識する他のターゲッティング部分により行われ得る。T細胞によるキリング(killing)は、これらの細胞の活性型による孔形成部分の放出の結果である。ターゲット組織へのターゲッティングは、膵臓に関する抗体により行われ得る。

TGF- β は、本発明のプレターゲッティングプロトコルを用いた炎症性疾患の治療にも使用され得る。そのように治療され得る慢性炎症性疾患の例は、慢性間接リウマチ、橋本甲状腺炎における甲状腺疾患、類結核性肉芽腫等である。TGF- β

は、線維芽細胞活性タンパク質または刺激を受けた間質性線維芽細胞上の抗原19を認識する抗体または他のターゲッティング部分により行われ得る。例えば、Re ttig et al., Cancer. Res., 53: 3327, 1993 参照。この方法において、TGF- β は、ペプチドメディエーター及びタンパク分解酵素により活性化された間質性線維芽細胞による慢性炎症の抑制に使用され得る。

例えば、ロリジンA、ベルカリンA、アンギジン、トリコテセン等のような活性薬剤の、プレターゲッティングプロトコルによるRNAへのデリバリーは、タンパク質合成抑制のメカニズムによりインシュリン依存型糖尿病または癌の治療を促進するであろう。ターゲット組織へのターゲッティングは、腫瘍特異的抗原

又は脾臓に関する抗体により行われ得る。

本発明の付加的な形態は、NR-LU-10抗体によって認識される抗原に局在化し得るモノクローナル抗体またはそのフラグメントのターゲティング部分を使用することに関する。このようなモノクローナル抗体またはフラグメントは、ネズミまたは他のヒト以外の哺乳類に由来の抗体でもよく、キメラもしくはヒト化抗体でもよくまたはヒト由来抗体でもよい。

NR-LU-10は、多くの癌腫で発現される約40キログルトンの糖タンパク質抗原を認識する分子量150キログルトンのIgG2bモノクローナル抗体である。NR-LU-10抗原に特異的な抗体を用いたマウスにおける *in vivo* 試験から、このような抗体が速やかにインターナリゼーションを受けないこと、後で投与される活性薬剤含有抱合体のターゲット部位局在化を妨害することが判明した。

NR-LU-10は、ヒト臨床試験で565人以上の患者に安全に投与された十分に特性決定された汎癌腫抗体である。ヒト小細胞肺癌の完全形(intact)細胞で免疫したマウス脾臓細胞とP3×63/Ag8UIネズミミエローマ細胞とを融合させることによってNR-LU-10を分泌するハイブリドーマを得た。シードロットを樹立した後、ハイブリドーマを *in vitro* 細胞培養法で増殖させ、精製し、純度及び不稔性を確認した。

ラジオイムノアッセイ、免疫沈降反応及び蛍光活性化セルソーター(FACS)分析を使用し、NR-LU-10の反応性プロファイルを作成した。NR-LU-10ターゲット抗原は、固定培養細胞中または種々の癌細胞の界面活性剤抽出物中に存在した。NR-LU-10

抗原は例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、結腸癌、乳癌、腎臓癌、卵巣癌、脾臓癌または他の癌組織中で観察される。NR-LU-10抗体の腫瘍反応性を表Aに示し、NR-LU-10の正常組織反応性を表Bに示す。表Bの値は後述する手順で得られた。NR-LU-10の組織反応性が陽性であることは、このような組織によってNR-LU-10抗原が発現されていることを示す。NR-LU-10抗原に関しては、Varkiet al., "Antigens Associated with a Human Lung Adenocarcinoma Defined by Monoclonal Antibodies" *Cancer Research*, 44:681-687, 1984、及びOkabe et al., "Mono

clonal Antibodies to Surface Antigens of Small Cell Carcinoma of the Lung," Cancer Research, 44:5273-5278, 1984 により詳細に記載されている。

3つの反応性パラメーター、即ち、(1)反応の強さ、(2)同細胞型における反応の均一性、及び、(3)抗体に対して反応性である細胞のパーセンテージ、に従って組織標本を評価した。これらの3つの値を合わせて0から500までの1つの重み付けした比較値で表す。500は反応性が最強であることを示す。この比較値によって種々の組織を容易に比較し得る。表Bは、要約した反応性の値、検査した組織標本の数、NR-LU-10との反応が陽性を示した標本の数を示す。

NR-LU-10抗原のエピトープに結合する抗体の調製方法は米国特許第5,084,396号に記載されている。簡単に説明すると、このような抗体は以下の手順で調製することができる。

ー多価抗原の第1のエピトープに対する第1のモノクローナル抗体を、免疫グロブリンと結合し得る不活性不溶性マトリックスに吸収させて免疫吸着体を形成し、

ー免疫吸着体を多価NR-LU-10抗原含有抽出物と合わせ、第1のモノクローナル抗体によって第1のエピトープが遮蔽された不溶化免疫複合体を形成する、

ー不溶化免疫複合体によって動物を免疫し、

ー免疫動物から採取した脾細胞をミエローマ細胞に融合させて、多価抗原の第2のエピトープに対する第2のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを形成し、

ーハイブリドーマを培養して第2のモノクローナル抗体を産生し、

ー第2のモノクローナル抗体をハイブリドーマ産物として収集する。

上記特許に記載の手順に従って調製されたモノクローナル抗体NR-LU-01、NR-LU-02及びNR-LU-03は本発明のこの形態に有用なターゲティング部分の例である。

ハイブリドーマ産生及びスクリーニングの標準的な手順によってNR-LU-10抗原と反応性を有する別の抗体を調製することができる。このように産生され同定されたハイブリドーマクローンはさらに、抗原及び組織反応性を確認するために上述のようにスクリーニングすることができる。

表 A
抗体の腫瘍反応性

器官/細胞型 腫瘍	陽性数 /試験数	強度 ^a		パーセント ^b		均一性 ^c	
		平均	範囲	平均	範囲	平均	範囲
脾臓癌	6/6	3	3	100	100	2.3	2-3
前立腺癌	9/9	2.8	2-3	95	80-100	2	1-3
肺腺癌	8/8	3	3	100	100	2.2	1-3
肺小細胞癌	2/2	3	3	100	100	2	2
肺扁平細胞癌	8/8	2.3	2-3	73	5-100	1.8	1-3
腎臓癌	8/9	2.2	2-3	83	75-100	1	1
乳腺癌	23/23	2.9	2-3	97	75-100	2.8	1-3
結腸癌	12/12	2.9	2-3	98	95-100	2.9	2-3
眼球悪性黒色腫	0/2	0	0	0	0	0	0
悪性黒色腫	0/11	0	0	0	0	0	0
卵巣癌	35/35	2.9	2-3	200	100	2.2	1-3
未分化癌	1/1	2	2	90	90	2	2
骨肉腫	1/1	2	2	20	20	1	1
滑液膜肉腫	0/1	0	0	0	0	0	0
リンパ腫	0/2	0	0	0	0	0	0
脂肪肉腫	0/2	0	0	0	0	0	0
子宮平滑筋肉腫	0/1	0	0	0	0	0	0

^a0-3の3段階評価。最大強度3。

^b被験組織切片中の染色細胞のパーセンテージ。

^c0-3の3段階評価。最高均一性3。

表B

器官/細胞型	陽性数/試験数	要約反応性
咽頭扁桃		
上皮	3	433
中心リンパ濾胞	0/3	0
末梢リンパ濾胞	2/2	400
脂肪組織		
脂肪細胞	0/3	0
副腎		
皮質索状層	0/3	0
皮質球状層	0/3	0
皮質網状層	0/3	0
髓質	0/3	0
大動脈		
内皮	0/3	0
内部弾性組織	0/3	0
外膜	0/3	0
中膜	0/3	0
小脳		
有髄軸索	0/3	0
ミクログリア	0/3	0
ニューロン	0/3	0
プルキンエ細胞	0/3	0
大脳		
有髄軸索	0/3	0
ミクログリア	0/3	0
ニューロン	0/3	0

表 B (続 き)

器官/細胞型	陽性数/試験数	要約反応性
中脳		
有髄軸索	0/3	0
ミクログリア	0/3	0
ニューロン	0/3	0
結腸		
粘膜上皮	3/3	500
外筋板	0/3	0
粘膜筋板	0/3	0
神経節	0/3	0
漿膜	0/1	0
十二指腸		
粘膜上皮	3/3	500
粘膜筋板	0/3	0
副睾丸		
上皮	3/3	419
平滑筋	0/3	3
精子	0/1	0
食道		
上皮	3/3	86
粘液腺	2/2	450
平滑筋	0/3	0
胆嚢		
粘膜上皮	0/3	467
平滑筋	0/3	0

表 B (続 き)

器官/細胞型	陽性数/試験数	要約反応性
心臓		
心筋	0/3	0
漿膜	0/1	0
脾臓		
リンパ節	0/2	0
粘膜上皮	0/2	0
外筋板	0/1	0
粘膜筋板	0/2	0
神経節	0/1	0
漿膜	0/1	0
空腸		
リンパ節	0/1	0
粘膜上皮	2/2	400
外筋板	0/2	0
粘膜筋板	0/2	0
神経節	0/2	0
漿膜	0/1	0
腎臓		
集合細管	2/3	160
遠位曲尿細管	3/3	500
糸球体上皮	0/3	0
糸球体間質	0/3	0
近位曲尿細管	3/3	500

表 B (続 き)

器官/細胞型	陽性数/試験数	要約反応性
肝臓		
胆管	3/3	500
中心小葉肝細胞	1/3	4
門脈周囲肝細胞	1/3	40
クッパー細胞	0/3	0
肺		
肺胞マクロファージ	0/3	0
気管支上皮	0/2	0
気管支平滑筋	0/2	0
肺細胞 I 型	3/3	354
肺細胞 II 型	3/3	387
リンパ節		
中心リンパ濾胞	0/3	0
末梢リンパ濾胞	0/3	0
乳腺		
肺胞上皮	3/3	500
管上皮	3/3	500
筋上皮細胞	0/3	0
骨格筋		
筋線維	0/3	0
神経		
有髄軸索	0/2	0
神経内膜	0/2	0
神経線維鞘	0/2	0
ニューロン	0/2	0
神経周膜	0/2	0

表B (続 き)

器官/細胞型	陽性数/試験数	要約反応性
卵巢		
黄体	0/3	0
上皮	1/1	270
顆粒層	1/3	400
漿膜	0/3	0
胞膜	0/3	0
卵管		
上皮	1/1	500
平滑筋	0/3	0
脾臓		
腺房細胞	3/3	500
管上皮	3/3	500
島細胞	3/3	500
腹膜		
中皮	0/1	0
下垂体		
腺下垂体	2/2	500
神経下垂体	0/2	0
胎盤		
栄養膜	0/3	0
前立腺		
結石	0/3	0
陰茎龟头上皮	3/3	400
平滑筋	0/3	0

表B (続 き)

器官/細胞型	陽性数/試験数	要約反応性
直腸		
リンパ節	0/2	0
粘膜上皮	0/2	0
外筋板	0/1	0
粘膜筋板	0/3	0
神経節	0/3	0
唾液腺		
腺房上皮	3/3	500
管上皮	3/3	500
皮膚		
アポクリン腺	3/3	280
基底層	3/3	33
上皮	1/3	10
濾胞	1/1	190
角質層	0/3	0
脊髄		
有髄軸索	0/2	0
ミクログリア	0/2	0
ニューロン	0/2	0
脾臓		
中心リンパ濾胞	0/3	0
末梢リンパ濾胞	0/3	0
柱平滑筋	0/3	0

表B (続 き)

器官/細胞型	陽性数/試験数	要約反応性
胃		
主細胞	3/3	290
粘膜上皮	3/3	367
粘膜/外筋板	0/3	0
壁細胞	3/3	290
平滑筋	0/3	0
基質組織		
脂肪	0/63	0
細動脈平滑筋	0/120	0
上皮	0/120	0
線維結合組織	0/120	0
マクロファージ	0/117	0
肥満細胞/好酸球	0/86	0
精巣		
間質細胞	0/3	0
セルトリ細胞	3/3	93
胸腺		
ハッサル上皮	3/3	147
ハッサルケラチン	3/3	333
リンパ皮質	0/3	0
リンパ髄質	3/3	167
甲状腺		
C細胞	0/3	0
コロイド	0/3	0
濾胞上皮	3/3	500

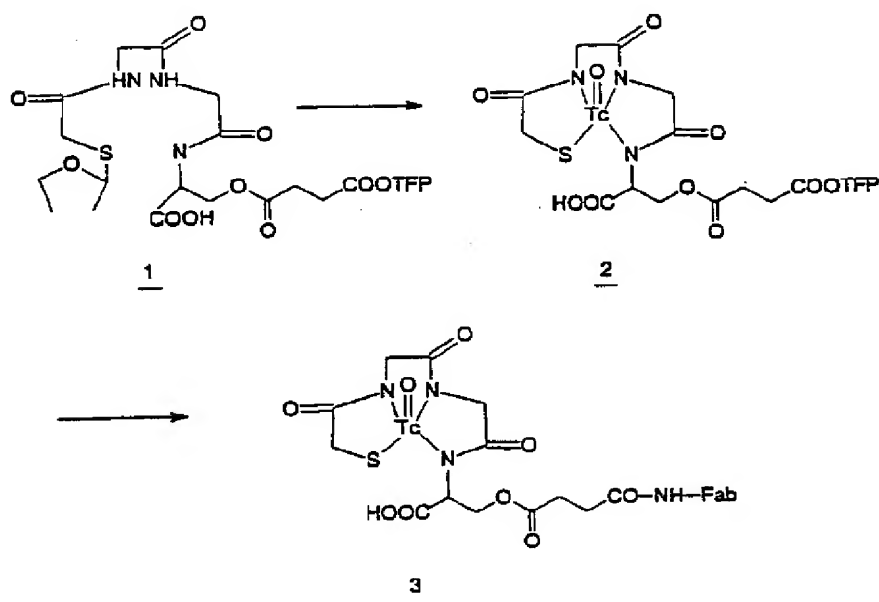
表B (続き)

器官/細胞型	陽性数/試験数	要約反応性
扁桃		
上皮	1/3	500
中心リンパ濾胞	0/3	0
末梢リンパ濾胞	0/3	0
粘液腺	1/1	300
横紋筋	0/3	0
臍帯		
上皮	0/3	0
膀胱		
粘膜上皮	3/3	433
漿膜	0/1	0
平滑筋	0/3	0
子宮		
子宮内膜上皮	3/3	500
子宮内膜腺	3/3	500
平滑筋	0/3	0
膣/頸		
上皮腺	1/1	500
平滑筋	0/2	0
扁平上皮	1/1	200

本発明の別の目的はリガンドと分子のキレート部分との間に準安定な結合を含む、プレターゲッティングに使用することを目的とした新しいビオチン-キレート包合体を生成することである。

以前の実験は、既に放射性免疫包合体として腸からの取り込みを少なくすることに関して臨床試験で評価されているリガンドに対して優れた特性を示すリガンドを同定する研究所で遂行されてきた(N_2S_2 、 N_3S 、MAGG-GABA)。これらの実験は、放射性標識し、リシン残基を介して抗体またはそのフラグメントに結合した場合、リガンドが腸への至適局在化までは示さないことを指示している。この事は

、肝臓におけるリガンド-Ab 包合体の代謝的分解を通して生産されるリガンド-リシン付加物が原因であると考えられた。腸の活性を減少させると同時に、腎臓のクリアランスを増加する努力から、リガンドと抗体分子間にエステル結合を取り込むことが示された。さらに、抗体包合体は腎臓から分泌されうる小分子を放出するように代謝することが予想される（それはリシン残基を欠いているであろうから）。この仮説を立証するために、s-エクソキシエチルメルカプトアセチルグリシルグリシルセリル-o- スクシニル- テトラフルオロフェニルエステル (1) を合成し、放射性標識し (2)、さらに、NR-LU-10 Fabに結合した (3)。



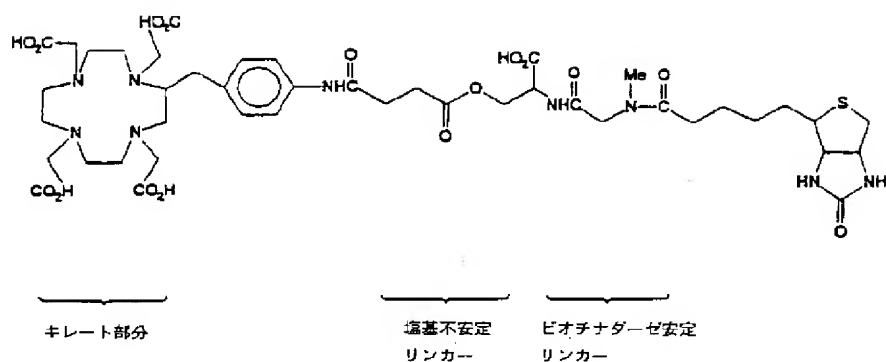
予想通り、ラットのモデルにおいて包合体 (3) は、腸においては約50%、腎臓においては約60% の放射性の減少を示した。包合体 (3) は、他の多くの包合体と比較して腫瘍マウスにおける腫瘍取り込みおよび放射性標識クリアランスに関して同様の生体分布を示し、このことはセリルスクシネート結合が血清的に安定であることを示している。

対照的に、標識リガンド (2) の結合実験では、生成する包合体 (3) は pH7.5 (pH7.0-7.5 が生理的である) よりも塩基性の pH (pH8.3-9.5) では不安定であることが示された。この不安定性はセリルサクシネート・エステル結合が中性付近の pH よりも塩基性 pH 領域で化学的に非常に不安定であることに起因すると考えられている。

治療プレターケッティング法においてNR-LU-10- ストレプトアビジン包含体およびY-DOTA- ビオチンを使用することは多くの本質的利点を提供するが、従来のRIT 法に比べて1つの重大な欠点を有する。特に、一次ターゲッティング・ベシクルとして使用し、つぎに安定なY-DOTA- ビオチンキレートで処理される場合、NR-LU-10- ストレプトアビジン包含体は腎臓において至適レベルの放射性標識を与えない。この事はコレクティング・チューブにおいて発現される抗原に対する包含体の交差反応性の結果であると考えられている。この交差反応性の結果としてビオチン化したリガンドの導入は腫瘍同様、この部位にプレターゲットされたストレプトアビジンへの結合を起こす。

従って、本発明の態様はリガンドのビオチン部分とキレート部分の間に準安定結合を有するリガンドを使用することにより放射性標識したキレートからの腎臓の被爆を減少または軽減する。例えば、正規の生理的条件下では安定であるか、これらの条件の部位特異的变化においては不安定となる結合を組み込むこともできる。この点において、腎臓のコレクティング・チューブが曝される尿のpHを重炭酸塩溶液を静脈注射で投与することにより血清のpHを有意に変化させること無しにpH8.5 に上げることが知られている。従って、尿のpHを上げるプロトコルを施すことにより、塩基不安定性結合を有するリガンドは当初腎臓ターゲット包含体に結合するが、包含体が塩基的尿環境に曝されたとき、(代謝的切断とは反対に)その結合の化学的切断で放射性標識したキレート部分が放出される。このよ

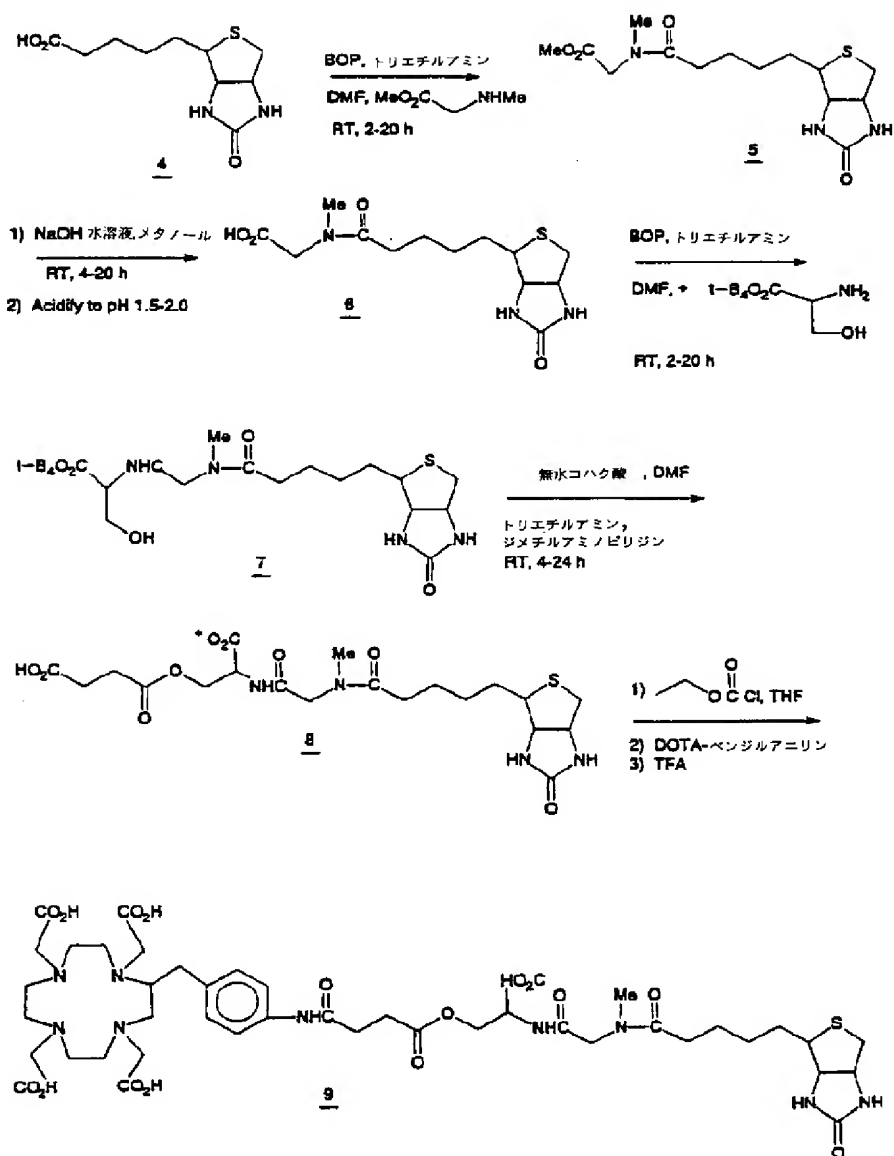
うなリガンドの1つを以下に示す。



このリガンドは放射性同位元素、ビオチナダーゼ安定化結合 (N-メチル・アミド

結合) および塩基不安定性結合であるセリルサクシネート・エステルを安定に結合するDOTAマクロサイクルを含んでいる。提唱されているこのリガンドの合成法を以下に示す。

提唱されるビオチンアミド-N-メチルグリシル-セリル-O-スクシンアミド-ベンジル-DOTA(9)の合成経路



本発明の別の目的は、キレート部分とビオチン部分が切断可能なリンカーで分離されている放射性キレートとビオチンを含む治療用包合体を生成することである。プレターゲットRIT に関する問題点は正常組織への放射能の蓄積である。理想的なキャリアはそれ自身優れた腎臓排出能を有していなければならない。

腎臓および／または消化管にデリバリーされる吸収された投与物の量を減らせることから切断可能なリンカーは有利である。この事は本質的に血清中では安定であるが、放射性代謝物の腎臓および腸における排出を増加させる包合体の選択を含んでいる。可能性のある切断可能なリンカーを有する化合物には、例えば以下の表に示した化合物が含まれる。

	反応温度 (°C)	反応時間 (min)	R ((v)/ (VI))	その他	エステル
N ₃ S-アジペート	75	30	4%	16%	80%
N ₃ S-1-セリル- ス クシネート	75	30	1%	23%	76%
N ₃ S-2-セリル- ス クシネート	75	30	14%	49%	37%
N ₃ S-3-セリル- ス クシネート	75	30	10%	26%	64%
N ₃ S-アミノ- エタ ノール	95	30	<1%	87%	13%
N ₃ S-アミノ- エタ ノール	75	30	12%	67%	21%

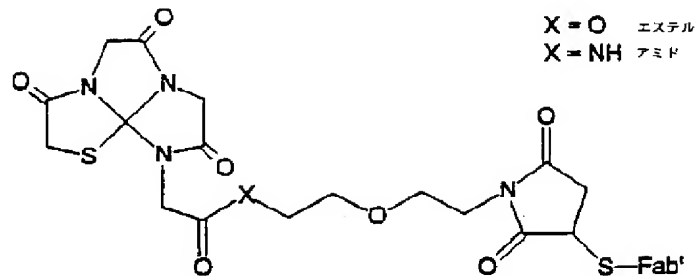
例えば、試験時にN₃S-3-セリル- スクシネート(3-55)はテケニチウムNR-LU-10

Fab包合体の良好な放射能化学的収率および生体分布を提供した。

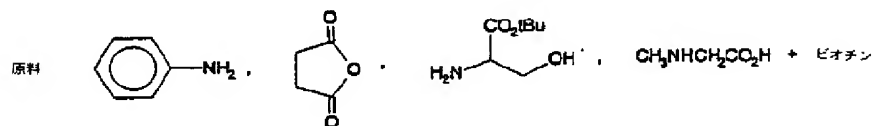
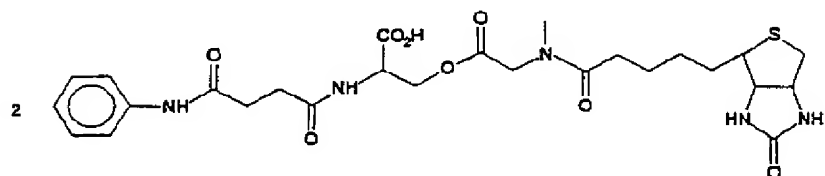
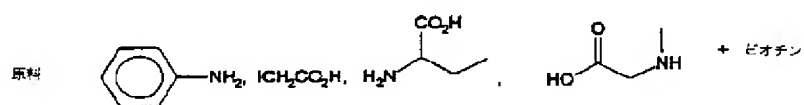
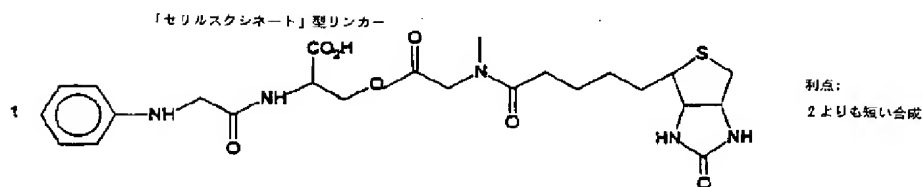
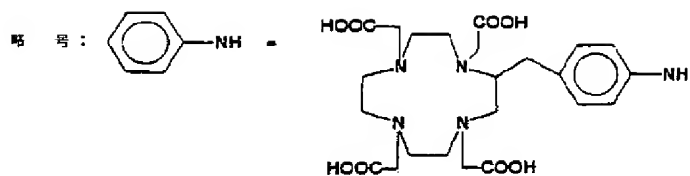
理想的には有効なリガンドは貯蔵安定性を有してなければならない。当業者はこれを測定しうる。例えば、このことは*in vitro*で種々の試験溶液中、37°Cで放射性標識した包合体をインキュベートすることで行いうる。一般に使用される試験溶液には新鮮な血清、50mg/ml HSA、5 mg/ml ジエチレンテトラミン五酢酸(DTPA)(pH7.5)および10mM システイン(pH7.5)が含まれる。

正常な組織のプレターゲットされたAb-StAvへの放射能のデリバリーを軽減するために、放射性キレートとビオチンの間に切断可能な結合を有することが望ましい。この事は正常な組織では選択的に切断されるが、腫瘍においては切断されないリンカーの選択を要する。この領域では実質的な研究がなされてきた。エステル結合は高い腫瘍/血液比を提供することが報告されている(Haseman, M.K. et

al., Eur.J.Nucl.Med., Metabolizable In-III chelate conjugated anti-idiot
 ype monoclonal antibody for radioimmunodetection of lymphoma in mice, 12
 :455-60(1986); Gustin, J.F., et al., Nuclear Med.Biol., Introduction of f
 ive Potentially Metabolizable Linking Groups Between In-III Cyclohexyl E
 DTA Derivatives and F(ab')₂ Fragments of Anti-Carcinoembryonic Antigen A
 ntibody-I. A New Reproducible Method, 20(6):755-62(1993); Mark Hylander
 et al., Bioconjugate Chemistry on PIP Ester-Linked Fab Conjugates; and
 Kasina, S., et al., The Third Conference on Radioimmunodetection and Rad
 ioimmunotherapy of Cancer, Princeton, NJ, 1990)。報告によると、以下に示す
 エステル結合 MAG₃ Fab' 包合体 1 は、アミド結合包合体に比べ、腎臓からのクリ
 アランスを2倍も向上させる (Weber, R.W., Bioconj.Chem., Enhanced kidney c
 learance with an ester-linked ⁹⁹Tc-radiolabeled antibody Fab'-chelator c
 onjugate, 1, 431-437(1990))。

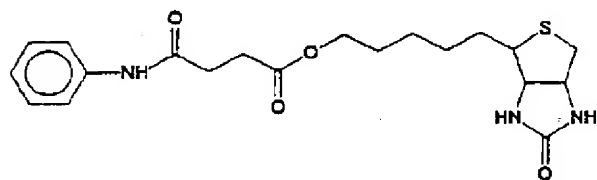


従って、以下に示すエステル結合したビオチンDOTA包合体は優れた正常組織排
 出性を示すと考えられる。



アルキルエステル型リンカー

1 還元型ビオチン (ビオチノール) から

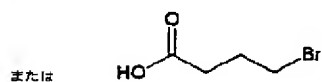
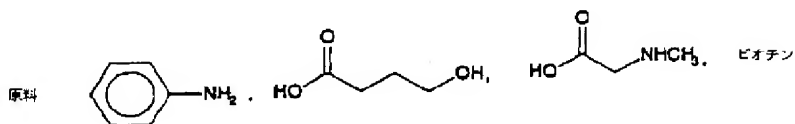
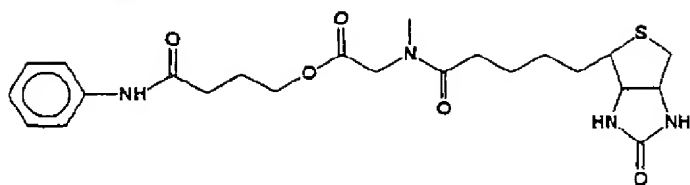


利点:
長さの短いリンカー
短い合成

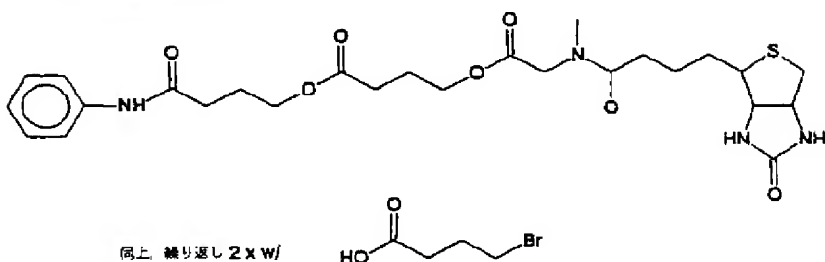
欠点:
必要な程度に
切断できない

BDS → 未知

2 ヒドロキシ酢酸のモノエステル



3 ヒドロキシ酢酸のジエステル



これらのリンカーに関して、第1の「セリル スクシネート」リンカーは、比較的短い合成手順からなることから有利である。アルキルタイプのリンカーについて、ビオチノールリンカーは、このリンカーが比較的短く、かつ合成が殆どルーチンであるので有利であることをさらに注意すべきである。当業者は、上記リンカーを合成し、かつ最適な特性、即ち放出速度を示すように決定することができる。但し、これらの構造は改良された正常組織排泄を提供するように構築できる開裂可能リンカーの代表例に過ぎない。本発明は、in vivo 投与により、ターゲット組織への放射性物質の満足のいくデリバリーと正常組織への毒性のかなり良いレベルを提供する、いずれの開裂可能エステル架橋ビオチンDOTA包合体も包含する。上記リンカーの合成は公知の合成技術を用いて当業者により行うことができる。

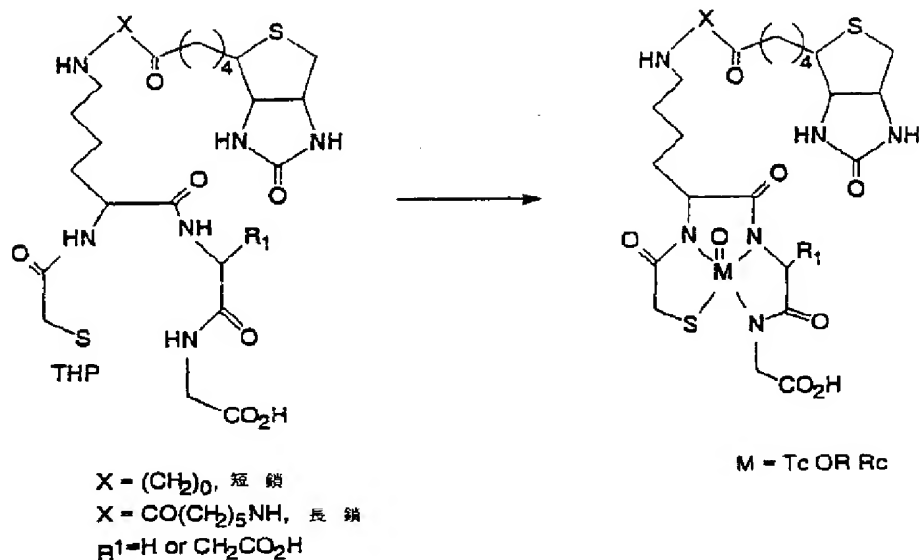
以下、実施例により本発明をさらに説明する。これらの実施例は単なる例示で

あり、これによって発明を制限するものではない。

実施例 I

キレート-ビオチン抱合体の合成

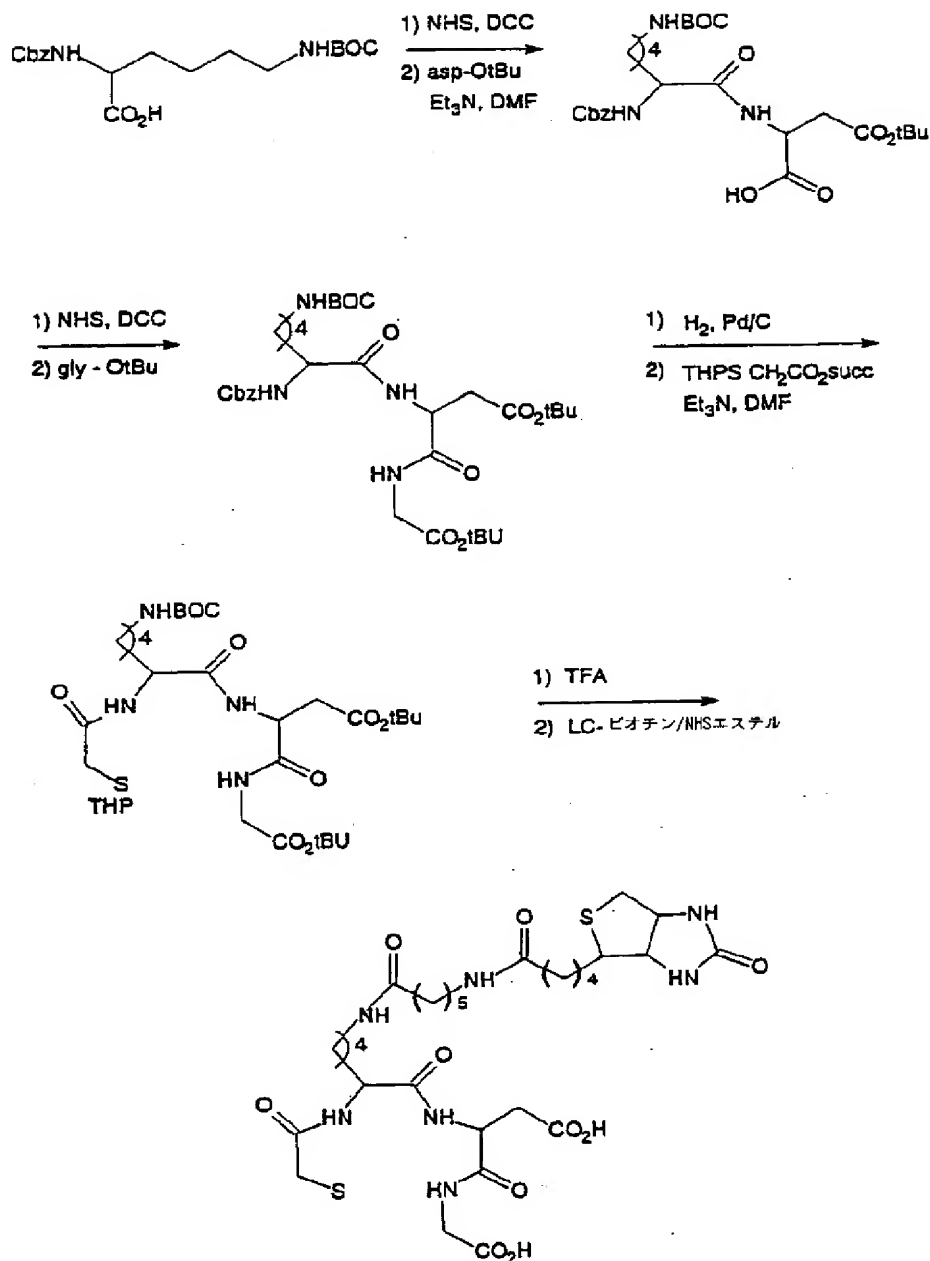
N_3S キレート核を含むキレート化合物をアミド結合によりビオチンと結合した。キレート-ビオチン抱合体の1例の放射性金属による標識化を下記に示す。



スペーサー基“X”は、抱合体のビオチン部分をアビジン結合に立体的に使用可能にする。“R¹”がカルボン酸置換基（例えば CH_2COOH ）であるとき、抱合体は改善された水溶性を示し、さらに放射性標識ビオチン抱合体の*in vivo*排泄を肝胆道性ではなく腎性のクリアランスに向かわせる。

簡単にいうと、N- α -Cbz-N- Σ -t-BOC保護リシンをNHS及びDCCでスクシンイミジルエステルに変換した後、アスパラギン酸 β -t-ブチルエステルと縮合した。得られたジペプチドをNHS及びDCCで活性化した後、グリシンt-ブチルエステルと縮合した。Cbz基を水添分解により除去し、テトラヒドロピラニルメルカプト酢酸スクシンイミジルエステルを用いてアミンをアシル化し、S-(テトラヒドロピラニル)メルカプトアセチルリシンを得た。N-t-BOC基とt-ブチルエステルのトリフルオロ酢酸開裂後、LC-ビオチン-NHSエステルと縮合し、(Σ -カプロイ

ルアミドビオチン)アスパルチルグリシンを得た。この合成方法を下記に示す。



¹H NMR: (CD₃OD, 200 MHz Varian) : 1.25-1.95(m, 24H), 2.15-2.25(広幅t, 4H), 2.65-3.05(m, 4H), 3.30-3.45(dd, 2H), 3.50-3.65(ddd, 2H), 3.95(広幅s, 2H), 4.00-4.15(m, 1H), 4.25-4.35(m, 1H), 4.45-4.55(m, 1H), 4.7-5.05(HODとオーバーラップするm)。

元素分析: C₃₅H₅₇N₇O₁₁S₂ · H₂OのC, H, N

計算値: 50.41, 7.13, 11.76

実測値: 50.13, 7.14, 11.40。

実施例II

テクネチウム又はレニウムで放射性標識した

キレート-ビオチン抱合体の調製

実施例Iのキレート-ビオチン抱合体を ^{99m}Tc 過テクネチウム酸塩又は ^{186}Re 過レニウム酸塩で放射性標識した。簡単にいうと、 ^{99m}Tc 過テクネチウム酸塩をグルコン酸ナトリウムの存在下に塩化第一錫で還元し、中間体のTc-グルコン酸錯体を形成した。実施例Iのキレート-ビオチン抱合体を加え、pH約1.8～約3.3で10分間で100℃まで加熱した。溶液をpH約6～約8まで中和し、 N_3S 配位 ^{99m}Tc -キレート-ビオチン抱合体を得た。1%酢酸中5～60%アセトニトリルを用いるC-18 HPLC勾配溶出の結果、 δ （ガンマ線）検出により97%以上の放射化学収率で2種のアノマーが検出された。

別法として、 ^{186}Re 過レニウム酸塩を冷過レニウム酸アンモニウムでスパイクし、塩化第一錫で還元し、クエン酸塩と錯化した。実施例Iのキレート-ビオチン抱合体を加え、pH約2～3で30分間に90℃まで加熱した。溶液をpH約6～約8まで中和し、 N_3S 配位 ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体を得た。1%酢酸中5～60%アセトニトリルを用いるC-18 HPLC勾配溶離の結果、85～90%の放射化学収率であった。次いでC-18逆相疎水性カラムで精製し、99%純度の物質を得た。

実施例III

放射性標識キレート-ビオチン抱合体のin vitro分析

^{99m}Tc -及び ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体の両者をin vitro評価した。

過剰のアビジン（約100倍モル過剰）を加えると、どちらの放射性標識ビオチン抱合体も100%がアビジンと結合した。

^{99m}Tc -ビオチン抱合体を種々の化学的負荷条件にかけた。簡単にいうと、 ^{99m}Tc -キレート-ビオチン抱合体にアビジンを加え、5cmサイズ排除ゲル濾過カラムに通した。放射性標識ビオチン-アビジン複合体を種々の化学的負荷（表1参照）にかけ、インキュベーション混合物をサイズ排除フィルターを通して遠心分離した。保持された放射能の百分率（アビジン-ビオチンに結合した放射性標識を表す）を表1に示す。このように、化学的負荷をかけても放射性金属は高分子複合体と

結合したままであった。

表 1

^{99m}Tc -キレート-ビオチン-アビジン錯体の化学的負荷

負荷媒体	pH	保持放射能%	
		1 時間, 37°C	18時間, 室温
PBS	7.2	99	99
リン酸塩	8.0	97	97
10 mM シス테인	8.0	92	95
10 mM DTPA	8.0	99	98
0.2 M 炭酸塩	10.0	97	94

さらに、各放射性標識ビオチン抱合体を約50 $\mu\text{g/ml}$ で血清と共にインキュベートし、インキュベーションの完了後、サンプルを80%メタノール中で瞬時薄層クロマトグラフィー (ITLC) にかけた。放射能の2~4%のみが起点に残留 (即ちタンパク質と結合) し、この百分率は外来ビオチンの添加の影響を受けなかった。0.2Mリン酸塩を移動相としてサイズ排除H-12 FPLCによりサンプルを分析したところ、放射能と血清高分子の結合は全く観察されなかった。

競合ビオチン結合アッセイにより各放射性標識ビオチン抱合体をさらに試験した。簡単にいうと、種々の比のD-ビオチンと放射性標識ビオチン抱合体を含有す

る溶液に一定の合計ビオチン:アビジン比で制限量のアビジンを加えた。各放射性標識ビオチン抱合体のアビジン結合をITLCにより測定し、理論的最大化学量論結合量 (Green, *Biochem. J.* 94:23c-24c, 1965のHABA分光光度アッセイにより測定) と比較した。各放射性標識ビオチン抱合体とD-ビオチンの間にアビジン結合の有意差は観察されなかった。

実施例 IV

抗体プレタールゲティング後に投与した

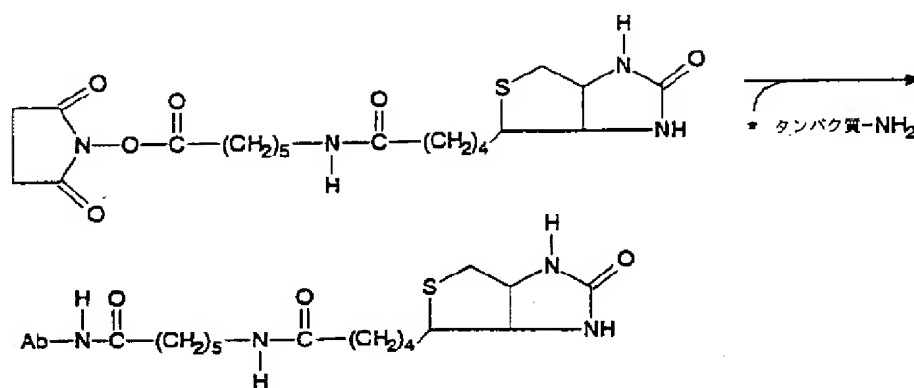
放射性標識キレート-ビオチン抱合体の *in vivo* 分析

実施例 I の ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体を3段階抗体プレタールゲティング

プロトコルの動物モデルで試験した。一般にこのプロトコルは(i)ビオチン化モノクローナル抗体の予備的局在化、(ii)ターゲット部位における「サンドイッチ」の形成と残留循環ビオチン化抗体のクリアランスのためのアビジンの投与、及び(iii)ターゲット部位局在化及び迅速な血中クリアランスのための ^{186}Re -ビオチン抱合体の投与を含む。

A. ビオチン化抗体の調製及び特性決定

ビオチン化NR-LU-10を下記手順のいずれかに従って調製した。第1の手順はリシンε-アミノ基を介する抗体の誘導化を用いた。クロラミンTと ^{125}I 又は ^{131}I ヨウ化ナトリウムのいずれかを使用してNR-LU-10をチロシンで放射性ヨウ素化した。次に、下記式に従って5%DMSOを含有する炭酸緩衝液(pH8.5)中のビオチンアミドカプロン酸NHSエステルを用いて放射性ヨウ素化抗体(5~10mg/ml)をビオチン化した。



リシンビオチン化が抗体免疫反応性に及ぼす影響を試験した。ビオチン：抗体の供給モル比が5:1から40:1に増加すると、ビオチン取り込みは予想通り増加した(HABAアッセイ及びプロナーゼ消化生成物を用いて測定)(下記表2)。天然抗体と比較したビオチン化抗体免疫反応性の百分率を制限量の抗原でのELISAアッセイで調べた。免疫反応性百分率は11.1:1の測定誘導化で70%未満に低下したが、この誘導化レベルで抗原陽性細胞結合(抗原過剰のLS-180腫瘍細胞で実施)の減少は観察されなかった。その後の実験では10:1のビオチン：抗体比で誘導化した抗体を用いた。

表 2

免疫反応性に及ぼすリシンビオチン化の効果

供給モル比 (ビオチン/Ab)	測定誘導化 (ビオチン/Ab)	免疫測定(%)	
		ELISA	細胞結合
5:1	3.4	86	
10:1	8.5	73	100
13:1	11.1	69	102
20:1	13.4	36	106
40:1	23.1	27	

別法として、システインの還元により生成されたチオール基を用いてNR-LU-10をビオチン化した。チオール基の誘導化は抗体免疫反応性をさほど悪化させないと仮定された。p-アリール錫フェニラートNHSエステル(PIP-NHS)と¹²⁵Iまたは³¹Iヨウ化ナトリウムのいずれかを用いてNR-LU-10を放射性ヨウ素化した。放射性ヨウ素化NR-LU-10を25mMジチオトレイトールと共にインキュベートし、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製した。次に、5%DMSO(v/v)を含有するリン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.5)中の10~100倍モル過剰のN-ヨードアセチル-N'-ビオチニルヘキシレンジアミンと還元抗体(遊離チオール基を含む)を反応させた。

表 3

免疫反応性に及ぼすチオールビオチン化の効果

供給モル比 (ビオチン/Ab)	測定誘導化 (ビオチン/Ab)	免疫測定(%)	
		ELISA	細胞結合
10:1	4.7	114	
50:1	6.5	102	100
100:1	6.1	95	100

表3に示すように、ビオチン：抗体供給モル比が50:1以上では1抗体当たり6個のビオチンしか取り込まれなかった。免疫反応性に対する有意影響は観察されなかった。

リシン及びチオール誘導化ビオチン化抗体（それぞれ「抗体(リシン)」及び「抗体(チオール)」）を比較した。サイズ排除FPLCで分子サイジングの結果、どちらのビオチン化プロトコルでも単分子（モノマー）IgGを生じることが立証された。ビオチン化抗体(リシン)は見かけの分子量が160kDであり、ビオチン化抗体(チオール)は見かけの分子量が180KDであった。内在スルフヒドリル(即ちジスルフィド)をチオール基に還元した後、ビオチンと結合すると、多少折り畳みがもとに戻った高分子が得られる。その場合には、抗体(チオール)はより大きい流体力学的半径を示し、クロマトグラフィー分析によると分子量の見かけ上の増加を示し得る。どちらのビオチン化抗体種も固定アビジン-アガロースと98%の特異結合を示した。

4%スタッキングゲルと5%分解ゲルを用いて非還元性SDS-PAGEによりビオチン化抗体種をさらに比較した。ビオチン化サンプルを放射性標識するかまたは標識せずに、放射性標識または未標識アビジンまたはストレプトアビジンに加えた。サンプルはSDS-PAGE分析前は煮沸しなかった。天然抗体とビオチン化抗体(リシン)は類似の移動を示し、ビオチン化抗体(チオール)は50~75kD範囲で2種を生成した。これらの種はチオールキャップをもつ2種に相当し得る。これらのSDS-PAGE条件下で、放射性標識ストレプトアビジンは60kDテトラマーとして移動する。400 μ g/mlの放射性標識ストレプトアビジンに50 μ g/mlのビオチン化抗体

を加えると(*in vivo*「サンドイッチ」条件と同様)、どちらの抗体種も分子量の大きい複合体を形成した。他方、ビオチン化抗体(チオール)-ストレプトアビジン複合体のみがスタッキングゲルから分解ゲルへと移動し、ビオチン化抗体(リシン)-ストレプトアビジン複合体に比較して低分子量であることが判明した。

B. ビオチン化抗体種の血中クリアランス

放射性ヨウ素化ビオチン化NR-LU-10(リシンまたはチオール)を非腫瘍ヌードマウスに用量100 μ gで静脈内投与した。放射性ヨウ素化ビオチン化NR-LU-10の投与から24時間後に、マウスに生理食塩水またはアビジン400 μ gを静脈内注射した。生理食塩水を投与した場合には、両者ビオチン化抗体種の血中クリアランスは二相性であり、天然NR-LU-10抗体のクリアランスに類似していた。

24時間後にアビジンを静脈内投与した動物では、ビオチン化抗体(リシン)はアビジン投与(アビジン:ビオチン=10:1)から15分以内に(注射用量の5%のレベルまで)クリアされた。ビオチン化抗体(チオール)ではアビジン投与(10:1または25:1)の結果、2時間後に注射用量の約35%まで循環抗体レベルが低下した。アビジン投与後の循環中の残留放射性標識抗体活性を固定化ビオチンにより *in vitro* 試験した。この分析の結果、ビオチン化抗体の85%がアビジンと結合していることが判明した。これらのデータは、形成されたビオチン化抗体(チオール)-アビジン複合体をRESによりクリアするには架橋が不十分であることを示唆している。

アビジンまたは生理食塩水投与から2時間後のビオチン化抗体(リシン)の血中クリアランス及び生体内分布試験を実施した。アビジン投与は血液中のビオチン化抗体濃度を有意に低下させ(図1参照)、肝臓及び脾臓中のビオチン化抗体濃度を増加させた。腎臓中のビオチン化抗体濃度は変わらなかった。

実施例 V

3段階プレターゲティングプロトコルによる

^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体の *in vivo* 特性決定

実施例 I の ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体(MW \approx 1000; 比活性 = 1~2mCi/mg)を動物モデルにおいて3段階プレターゲティングプロトコルで試験した。

より具体的には、18~22gの雌ヌードマウスにLS-180ヒト結腸腫瘍異種移植片を皮下移植し、移植から10日以内に100~200mgの腫瘍を生成した。

(上記実施例IV.Aに記載したように)NR-LU-10(MW \approx 150kD)を ^{125}I /クロラミンTで放射性標識し、リシン残基を介してビオチン化した。アビジン(MW \approx 66kD)を(上記実施例IV.AでNR-LU-10の放射性ヨウ素化について記載したように) ^{131}I /PIP-NHSで放射性標識した。実験プロトコルは以下の通りであった。

グループ1:時刻0で100 μg の ^{125}I 標識ビオチン化NR-LU-10を注射。

24時間後に400 μg の ^{131}I 標識アビジンを注射。

26時間後に60 μg の ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体を注射。

グループ2:時刻0で400 μg の ^{131}I 標識アビジンを注射。

(対照) 2時間後に60 μg の ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体を注射。

グループ3:時刻0で60 μ gの ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体を注射。

(対照)

このプロトコルで使用する3種の放射性標識は相互の存在下で検出ことができる。使用する3成分の寸法が対数的に異なり、抗体 $\approx 150,000$ 、アビジン $\approx 66,000$ 、ビオチン $\approx 1,000$ である点にも着目すべきである。 ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体の投与から2、6、24、72及び120時間後に生体内分布分析を実施した。

3段階プレターゲットティングプロトコルで ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体を分析する前に動物モデルで所定の予備試験を実施した。まず最初に、アビジンの血中クリアランスに及ぼすビオチン化抗体の効果を試験した。これらの実験の結果、アビジンクリアランス速度及び程度はビオチン化抗体の有無に拘わらず同様であった。2番目に、 ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体の血中クリアランスに及ぼすビオチン化抗体とアビジンの効果を試験した。血中クリアランスはビオチン化抗体とアビジンの有無に拘わらず同様であった。さらに、抗体免疫反応性は試験濃度ではビオチン化によって悪化しないことが判明した。

第3に、時刻0で投与したビオチン化抗体と24時間後に投与したアビジンの腫瘍取り込みを試験した。この実験の結果を図1に示す。25時間で約350pmol/gのビオチン化抗体が腫瘍に存在し、32時間で濃度は約300pmol/gであり、48時間で約200pmol/g、120時間で約100pmol/gであった。同一時点でのアビジン取り込

みはそれぞれ約250、150、50及び0pmol/gであった。同一の実験からビオチン化抗体とアビジンとについて腫瘍対血液比を測定した。32時間から120時間では、腫瘍対血液比は非常によく似ていた。

アビジンとの結合によりビオチン化抗体を血液から迅速且つ効率よく除去できることが判明した。アビジン投与から2時間以内に血液プール抗体濃度の10分の1の低下が認められ(図1)、腫瘍対血液比は急激に増加した。アビジンは迅速にクリアされ、投与後1時間以内に注射用量の90%を上回る量が血液からクリアされた。 Re-186 -ビオチンキレートも非常に迅速に除去され、投与後1時間までに注射用量の99%を上回る量が血液からクリアされた。

次に(上記グループ1について記載した)3段階プレターゲットティングプロトコル

を試験した。より具体的には、ビオチン化抗体とアビジンの存在下または不在下の ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体の腫瘍取り込みを測定した。ビオチン化抗体とアビジンの不在下では、 ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体は注射から2時間後にかすかなピークを示し、約5時間までに腫瘍から実質的にクリアされた。これに対してビオチン化抗体とアビジン(特異的)の存在下では、注射から2時間後に ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体はビオチン化抗体とアビジンの不在下で観察されるものの約7倍の腫瘍におけるピークに達した。さらに、特異的に結合した ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体は50時間を上回る時間にわたって有意レベルで腫瘍に保持された。同一の実験で腫瘍対血液比を測定したところ、経時的に有意に増加した(即ち30時間で $T:B \approx 8$ 、100時間で ≈ 15 、140時間で ≈ 35)。

^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体の腫瘍取り込みはさらにビオチン化抗体の投与量に依存することが判明した。ビオチン化抗体 $0 \mu\text{g}$ では投与から2時間後に腫瘍に約 200 pmol/g の ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体が存在し、抗体 $50 \mu\text{g}$ では約 500 pmol/g の ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体、抗体 $100 \mu\text{g}$ では約 $1,300 \text{ pmol/g}$ の ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体が存在した。

3段階プレターゲットイングプロトコルによるレニウム腫瘍取り込みを、抗体に共有結合したキレートを介して放射性標識した同一抗体の腫瘍取り込み(従来の手順)と比較した。この比較の結果を図2に示す。キレートで直接標識したレニ

ウム抗体抱合体と3段階でプレターゲットイングしたサンドイッチについて血中クリアランスと腫瘍取り込みを比較した。曲線下の面積(AUC)と $\text{AUC}_{\text{tumor}}/\text{AUC}_{\text{blood}}$ の比を測定した。キレートで直接標識したレニウム抗体抱合体では $\text{AUC}_{\text{tumor}}/\text{AUC}_{\text{blood}}$ の比 = $24055/10235$ 、即ち2.35であり、3段階でプレターゲットイングしたサンドイッチでは $\text{AUC}_{\text{tumor}}/\text{AUC}_{\text{blood}}$ の比 = $46764/6555$ 、即ち7.13であった。

腫瘍取り込みの結果は血液区画の放射能被曝の観点から最もよく理解され、これは骨髓被曝と直接相関する。3段階プロトコルでは100倍のレニウムを動物に投与したにも拘わらず、血液からの小分子(^{186}Re -ビオチン)の非常に迅速なクリアランスにより、上記のように与えられる ^{186}Re 被曝を最小限にできる。同一のマッチした抗体用量のフォーマットで、直接標識した(従来手順)NR-LU-10完全

抗体は3段階プロトコルの100倍の線量のレニウム被曝をもたらした。3段階ブ
レターゲティング(約7:1)では直接標識抗体法(約2.4:1)と比較してターゲティン
グ比(腫瘍の放射能被曝:血液の放射能被曝即ち $AUC_{tumor}:AUC_{blood}$)の明白な増
加が観察された。

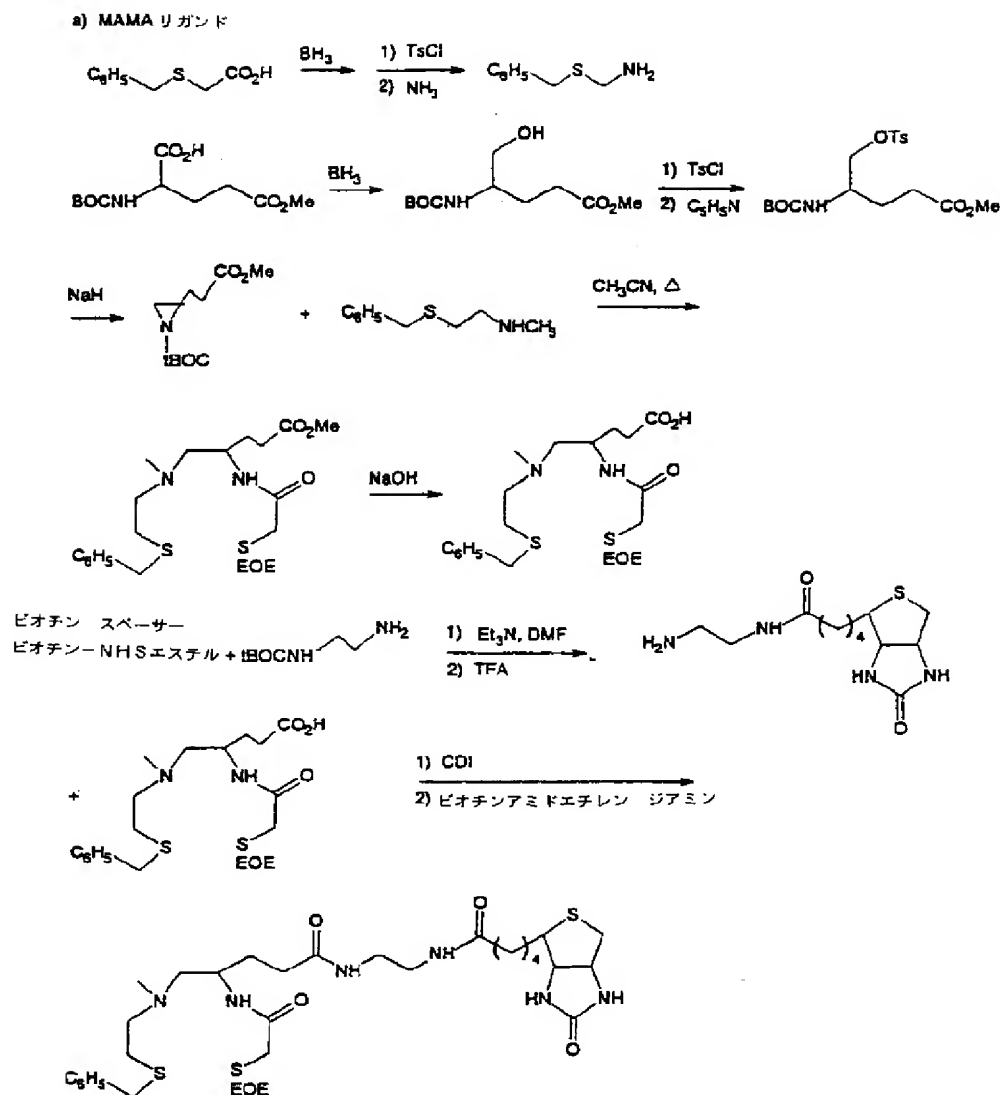
実施例VI

改善された生体内分布特性をもつキレート-ビオチン抱合体の調製

^{111}In 標識ビオチン誘導体の生体内分布はキレート及び結合基の構造変化によ
って大幅に変化する。このような構造変化はテクネチウム-及びレニウム-ビオチ
ン抱合体の生体内分布にも影響し得る。従って、正常組織からの最適なクリアラ
ンスを示すテクネチウム-及びレニウム-ビオチン抱合体を調製する方法が有利で
ある。

A. 中性MAMAキレート／抱合体

下記式に従って中性MAMAキレート-ビオチン抱合体を調製する。

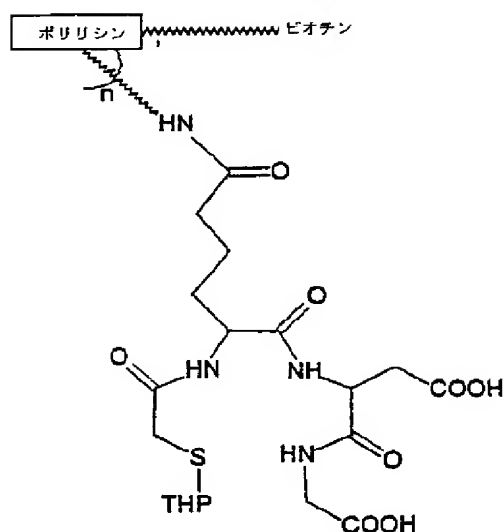


得られたキレート-ビオチン抱合体は優れた腎臓排泄を示す。抱合体の正味総電荷は中性であるが、分子のポリカルボキシレート性により親水性と疎水性の領域を生じる。抱合体内のカルボキシレート基の数及び種類を変えることにより、排泄を腎臓から胃腸経路に移すことができる。例えば、中性化合物は一般に腎臓によりクリアされ、アニオン性化合物は一般に胃腸系を介してクリアされる。

B. ポリリシン誘導化

ポリリシンを含む抱合体も有益な生体内分布特性を示し得る。完全抗体をポリリシンで誘導化すると、抱合体の生体内分布は肝臓取り込みに向かう傾向がある。これに対してFabフラグメントをポリリシンで誘導化すると、肝臓及び腎臓両者の低い取り込みレベルを生じ、これらの抱合体の血中クリアランスはキレート

に共有結合したFabに類似する。ポリリシン誘導化キレート-ビオチン抱合体の例を下記に示す。



従って、放射性金属-キレート-ビオチン抱合体にポリリシンを加えると、抱合体の良好な肝臓及び腎臓クリアランスを維持しながらRES金属イオン封鎖を最小限にするか消失させるために有用である。腎臓排泄特性を改善するためには、ビオチン化後にポリリシン誘導体をスクシニル化すると好適である。ポリリシン誘導体はさらに、(1)放射性金属-キレート-ビオチン抱合体の比活性を増加し、(2)ポリリシンポリマーの分子量を変えることにより血中クリアランス速度及び

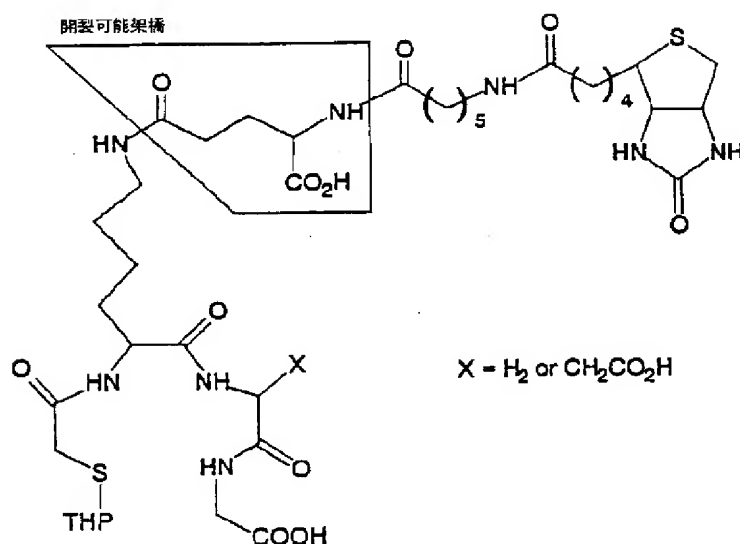
経路を調節することができ、(3)最適な腫瘍相互作用のために抱合体の循環半減期を増加するといった利点も提供する。

ポリリシン誘導化は標準的な方法により達せられる。簡単にいうと、ポリ-L-リシンを標準的なアミノ基アシル化手順(pH8の水性重炭酸緩衝液にビオチン-NHSエステル、次いでキレート-NHSエステルを加える)に従ってアシル化する。別法としては、DMSO及びトリエチルアミン中でニトロフェニルエステルを用いる無水条件もある。得られた抱合体をUV及びNMRスペクトルにより特性決定する。

ポリリシンに結合したビオチンの数をHABAアッセイにより測定する。分光光度滴定を用いてアミノ基誘導化の程度を評価する。放射性金属-キレート-ビオチン抱合体をサイズ排除により特性決定する。

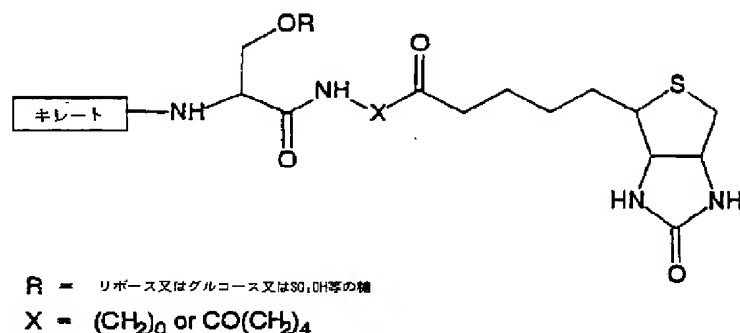
C. 開裂可能な結合

放射性金属-キレート-ビオチン抱合体のキレート及びビオチン部分間に開裂可能なリンカーを挿入することにより、正常組織よりも腫瘍への抱合体の保持を強化することができる。より具体的には、正常組織中に存在するが腫瘍組織中には不足または不在の酵素により開裂されるリンカーは腫瘍保持を増加できる。例として、腎臓は高いγグルタミルトランスフェラーゼ濃度をもち、他の正常組織はγグルタミルプロドラッグの *in vivo* 開裂を示す。これに対して、腫瘍は一般に酵素ペプチダーゼを欠失している。下記に示すグルタミル結合ビオチン抱合体は正常組織中で開裂され、腫瘍中で維持される。



D. O-極性置換基をもつセリンリンカー

N₃Sキレートを糖置換すると、このようなキレートは水溶性になる。生理的pHで完全にイオン化されるスルホン酸塩は下記キレート-ビオチン抱合体の水溶性を改善する。



この化合物は標準的な反応手順に従って合成される。簡単にいうと、ビオシチンをN-t-BOC-(O-スルホン酸またはO-グルコース)セリンNHSエステルと縮合させ、N-t-BOC-(O-スルホン酸またはO-グルコース)セリンビオシチンアミドを生成する。次いでN-t-BOC基をTFAで開裂し、トリエチルアミンを含むDMF中でリガンドNHSエステルと縮合させると、リガンドアミドセリン(O-スルホン酸またはO-グルコース)ビオシチンアミドが得られる。

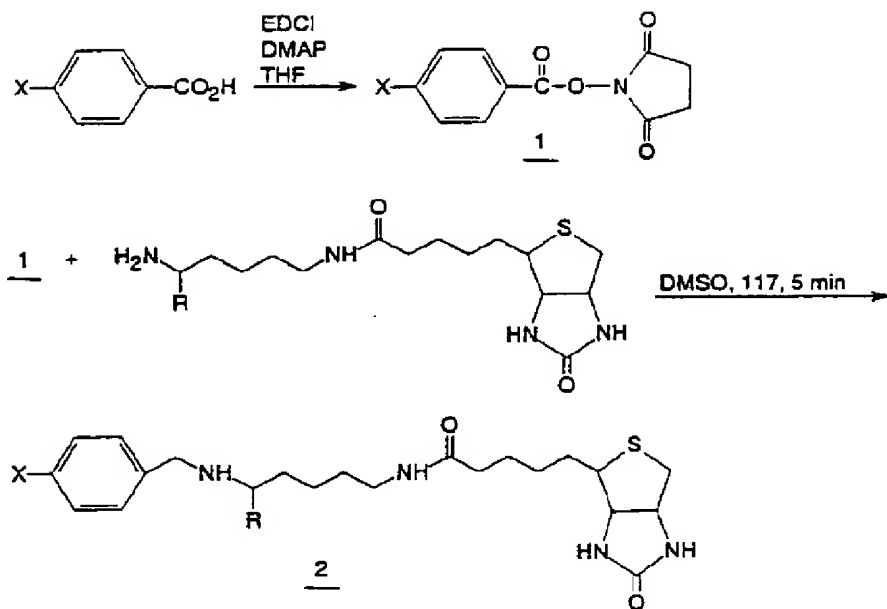
実施例VII

PIP放射性ヨウ素化ビオチンの製造及び特性決定

ポリ-L-リシンを過剰のNHS-LC-ビオチン、次いでDMSO中のボルトン-ハンター(Bolton-Hunter)N-ヒドロキシスクシンイミドエステルに曝露して調製した放射性ヨウ素化ビオチン誘導体が報告されている。精製後、この生成物はヨウ素産生体法により放射性標識されたものである(例えばDel Rosario et al., J.Nucl.Med. 32:5, 1991, 993(abstr.))。得られた放射性ヨウ素化ビオチン誘導体は高分子量であるため、制限された生成物の特性決定(即ち放射性HPLC及び固定ストレプトアビジンとの結合)しかできなかった。

本発明により放射性ヨウ素化ビオチンを調製するといくつかの利点がある。まず第1に、放射性ヨードビオチン誘導体は低分子量であるため、完全な化学的特性決定が可能である。第2に、本発明の製造方法は1段階であり、精製段階が不要である。

簡単にいうと、下記式に従ってビオシチン(R=COOH)及びビオチンアミドベンチルアミン(R=H)に対応するヨードベンズアミド誘導体を調製した。下記式中、“X”は任意の放射性ハロゲンでよく、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{211}At 等を含む。



1の製造はトリブチル錫中間体を用いてWilbur et al., J.Nucl.Med. 30:216-26, 1989に概ね従った。NHSエステル1はDCUと共に処理しにくい混合物を形成したので、上記反応では水溶性カルボジイミドを使用した。NHSエステルはクロマトグラフィーに適合せず、有機溶剤及び水性溶剤に不溶性であり、DMFまたは緩衝水性アセトニトリル中でビオシチンと反応しなかった。1とビオシチンまたは5-(ビオチンアミド)ペンチルアミンの反応は塩基に感受性であった。1とビオシチンまたはペンチルアミンの反応を熱DMSO中でトリエチルアミンの存在下に実施すると、2種以上のビオチン化生成物が形成された。これに対して1とビオシチン(4mg/ml)またはペンチルアミン(4mg/ml)の懸濁液をDMSO中で約5～

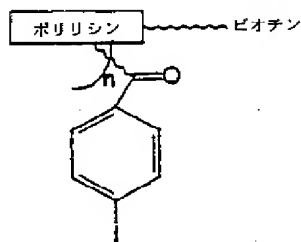
約10分間117℃に加熱したところ、反応は極めて清浄且つ完全であった。この結果、¹²⁵I-ビオチン誘導体が94%の放射化学収率で得られた。場合によっては、C-18 HPLC 及び逆相疎水性カラムを使用して放射性ヨウ素化生成物を精製してもよい。以下の文中では、得られた放射性ヨウ素化生成物2をPIP-ビオシチン(R=COOH)及びPIP-ペンチルアミン(R=H)と呼ぶ。

ヨードビオチン誘導体2の両者は固定アビジンに対して≧95%の結合を示した。生成物2をマウス血清と共にインキュベートしたところ、2は固定アビジンと結合する能力を失わなかった。雄性BALB/cマウスで2の生体内分布試験を行った

ところ、(上記 ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体と同様に)血液からの迅速なクリアランスが示された。放射性ヨードビオチン 2 は ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体と比較して肝胆道性排泄が減少し、 ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体と比較して尿排泄が増加した。2 の尿代謝物の分析によると、脱ヨウ素化及びビオチンアミド結合の開裂が判明し、代謝物は固定アビジンとの結合を示さなかった。これに対して、 ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体の代謝物は無傷のビオチン抱合体として尿中に排泄されると思われる。2 の腸内取り込みは ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体の<50%である。2 のこれらの生体内分布特性は放射性同位体の全身クリアランスを強化し、プレターゲットティングプロトコルにおける 2 の使用の利点を示す。

腫瘍をもつマウスで ^{131}I -PIP-ビオシチンを2段階プレターゲットティング手順で評価した。簡単にいうと、雌性ヌードマウスにLS-180腫瘍細胞を皮下注射すると、7日後にマウスは50~100mgの腫瘍異種移植片を示した。 $t=0$ でPIP-NHSを使用して ^{125}I で標識(実施例IV.A.参照)したNR-LU-10-アビジン抱合体 $200\mu\text{g}$ をマウスに注射した。 $t=36\text{h}$ でマウスに ^{131}I -PIP-ビオシチン $42\mu\text{g}$ を投与した。データはアビジン1分子当たり約(≒)1.5個の ^{131}I -PIP-ビオシチン分子に対応する即時の特異的腫瘍局在を示した。

記載する放射性ハロゲン化ビオチン化合物は、上記実施例VIで ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体について記載したのと同じ種類の修飾が可能である。特に、ポリリシンを ^{125}I -PIPで痕跡標識した後、ポリリシンを十分にビオチン化することにより下記PIP-ポリリシン-ビオチン分子が製造される。



固定アビジンに対する ^{125}I 結合を測定することにより、全放射性ヨウ素化種は少なくとも1当量のビオチンも含むことが確認される。

実施例VIII

内在抗体スルフヒドリル基またはスルフヒドリル生成化合物を介する

ビオチン化抗体(チオール)の調製

反応に使用可能な内在的なスルフヒドリル基をもつ抗体もある。ビオチン化しようとする抗体が内在的なスルフヒドリル基を含む場合には、このような抗体を(上記実施例IV.Aに記載したように)N-ヨードアセチル-n'-ビオチニルヘキシレンジアミンと反応させる。1個以上の内在的なスルフヒドリル基を使用できるので、ビオチン化抗体に他の有害な影響を及ぼし得るDTT等の還元剤に抗体を曝す必要がなくなる。

あるいは、末端スルフヒドリル基を含む化合物またはリンカーを使用することにより1個以上のスルフヒドリル基をターゲティング部分に結合する。この目的の化合物の1例はイミノチオランである。こうして(上記の)内在的なスルフヒドリル基によるのと同様に、抗体に及ぼす還元剤の有害な作用が回避される。

実施例IX

インターナリゼーションを誘発しない2段階プレターゲティング法

以下のようにしてNR-LU-13-アビジン抱合体を調製する。まず最初にアビジンをN-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)で誘導化する。次にSMCC誘導アビジンをNR-LU-13と共に1:1モル比でpH8.5において16時間インキュベートする。調製用サイズ排除HPLCを用いて未反応NR-LU-13及びSMCC誘導アビジンを混合物から除去する。主産物として所望の1:1 NR-LU-13-アビジン抱合体及び副次的産物として完全に特性決定されていない成分の2種の抱合体が生成物として得られる。

上記実施例IIのように ^{99m}Tc -キレート-ビオチン抱合体を調製する。NR-LU-13-アビジン抱合体をレシピエントに投与し、循環から排出させる。放射免疫シンチグラフィ分野の通常の技術者はNR-LU-13-アビジン抱合体の腫瘍局在及び循環からのクリアランスに最適な時間を容易に決定することかできる。そのような時点で ^{99m}Tc -キレート-ビオチン抱合体をレシピエントに投与する。

^{99m}Tc -キレート-ビオチン抱合体は $\approx 1,000$ の分子量を有するので、腫瘍細胞

の表面上のNR-LU-13-アビジン分子の架橋は劇的に減少するかまたは消失する。その結果、 ^{99m}Tc 診断薬は腫瘍細胞表面に長時間保持される。従って、画像形成技術による診断薬の検出が最適なものとなり、さらにより低い線量の放射性同位体を用いて典型的な3段階プレターゲットティングプロトコルで得られると同等の画像が得られる。

場合によっては、プラズマフェレシスをビオチンアフィニティーカラムと組み合わせて循環からのNR-LU-13-アビジンのクリアランスを促進することができる。このようなカラムを用いることにより、循環NR-LU-13-アビジンは体外に保持され、レシピエントの免疫系が大きいタンパク性免疫原(即ちアビジン)になるべく曝されないようにする。

本発明の実施に有用なプラズマフェレシス／カラム精製方法の1例は、腫瘍ターゲット部位の画像形成及び処理における放射性標識抗体力価の低減に関連して米国特許第5,078,673号に記載されている。簡単にいうと、本発明の目的のための体外クリアランス法の1例は、

リガンド-またはアンチリガンド-ターゲットティング部分抱合体をレシピエントに投与する段階と、

投与した抱合体がターゲット部位に局在するのに十分な時間後、血液を例えばプラズマフェレシスによってレシピエントから取り出す段階と、

細胞成分を前記血液から分離して血清分画を生成し、細胞成分をレシピエントに戻す段階と、

投与した抱合体の血清分画中の力価を低減させて精製血清を生成する段階と、

精製した血清をレシピエントに再び注入段階とを含み得る。

粒状型クリアリング剤(例えば複数のビオチン分子が結合したポリマー粒子)を投与してもNR-LU-13-アビジンのクリアランスは促進される。このような粒状クリアリング剤は複数のビオチン分子が結合した生分解性ポリマーキャリアを構成することが好ましい。本発明の粒状クリアリング剤は投与された循環抱合体と結合し、該抱合体をレシピエントからクリアする能力を示す。本発明のこの形態の粒状クリアリング剤はこの目的に適した任意の構成をとり得る。好適な粒状ク

リアリング剤は下記特徴の1つ以上を示す。

－微粒状(例えば直径約 $0.5\mu\text{m}$ ～約 $100\mu\text{m}$ 、より好ましくは約 $0.5\sim$ 約 $2\mu\text{m}$)のさらさらした粉末構造、

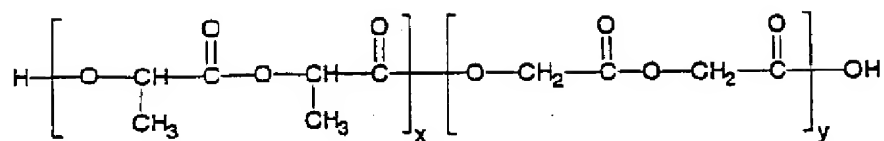
－約3～約180日間、より好ましくは約10～約21日間で生分解するように設計された生分解性構造、または非生分解性構造、

－クリアリング剤の分布、代謝及び排泄の過程にわたってレシピエント生理機構と生体適合し、より好ましくは生体適合性生分解生成物を含む、

－1個以上の結合部分(好ましくはリガンド／アンチリガンド対の相補的なメンバー)を介してレシピエントから消失あるいは除去され易くするように1個以上の循環抱合体と結合できる。粒状クリアリング剤の総モル結合能は、選択された粒子径及びリガンドまたはアンチリガンド置換比に依存する。結合部分は本明細書中に記載するように共有または非共有的な形態で粒状剤形の表面構造と結合することができ、先に投与した循環する結合対のメンバーとの結合に使用可能なリガンドまたはアンチリガンドを提供する。

本発明の好適な粒状クリアリング剤は生分解性または非生分解性の微粒子である。より好ましくは、粒状クリアリング剤はランダムな非酵素的加水分解切断により生分解するマトリックスを含むポリマーから形成される。

本発明での使用のためには α ヒドロキシカルボン酸及び関連ラクトンの縮合から誘導されるポリマーが好ましい。特に好適な部分は熱可塑性ポリエステル(例えばポリラクチドまたはポリグリコリド)の混合物または、ポリ(ラクチド-コグリコリド)等のラクチド及びグリコリド成分のコポリマーから形成される。構造の例としてランダムポリ(DL-ラクチド-コグリコリド)を下記に示す。x及びyの値は、当業者によれば望ましい微粒子特性が得られるように操作することが可能である。



本発明の粒状クリアリング剤を形成するのに適した他の物質としてはポリオル

トエステル類とポリアセタール類(Polymer Letters, 18:293, 1980)及びポリオルトカーボネート(米国特許第4,093,709号)等が挙げられる。

本発明のマトリックス粒子を含む好適な乳酸／グリコール酸ポリマーはエマルジョンに基づく方法により製造され、これは溶剤抽出法の変法であり、このような方法は例えば、Cowsar et al., "Poly(Lactide-Co-Glycolide)Microcapsules for Controlled Release of Steroids," Methods Enzymology, 112:101-116, 1985(微粒子中へのステロイドトラップ); Eldridge et al., "Biodegradable and Biocompatible Poly(DL-Lactide-Co-Glycolide)Microspheres as an Adjuvant for Staphylococcal Enterotoxin B Toxoid Which Enhances the Level of Toxin-Neutralizing Antibodies," Infection and Immunity, 59:2978-2986, 1991(トキシソイドトラップ); Cohen et al., "Controlled Delivery Systems for Proteins Based on Poly(Lactic/Glycolic Acid)Microspheres," Pharmaceutical Research, 8(6):713-720, 1991(酵素トラップ); 及びSanders et al., "Controlled Release of a Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue from Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide)Microspheres," J.Pharmaceutical Science, 73(9):1294-1297, 1984(ペプチドトラップ)に記載されている。

一般に、本発明の粒状クリアリング剤を形成する手順は、ポリマーをハロゲン化炭化水素溶剤に溶解する段階と、ハロゲン化炭化水素溶剤については溶剤として機能するがポリマーの溶剤としては機能しない付加物質を加える段階を含む。ポリマーはポリマー-ハロゲン化炭化水素溶液から析出する。粒子形成後、洗浄し、有機溶剤で硬化させる。次いで水洗段階と水性非イオン界面活性剤による洗浄段階を行い、その後室温で減圧乾燥する。

生体適合性の用途のためには、粒状クリアリング剤を包装、貯蔵または投与前に滅菌する。滅菌はこの目的に適した任意の方法で実施することができる。例えば、 γ 線照射が粒子に結合している結合部分の構造または機能に悪影響を与えない場合には、粒子に γ 線を照射することができる。結合部分が悪影響を受ける場合には、粒状クリアリング剤を滅菌条件下で製造すればよい。

好適なラクチド／グリコリド構造は哺乳動物生理環境に生体適合性を示す。ま

た、これらの好適な徐放性投与形態は、その生分解によりいずれも哺乳動物の通常の代謝産物である乳酸とグリコール酸を形成するという利点がある。

場合によっては非分解性または生分解性ポリマー単位と共に結合部分と粒子の結合に必要な官能基を粒状構造に組み込む。この目的に使用可能な官能基としては、リガンドまたはアンチリガンドと反応性の基が挙げられ、例えばカルボキシル基、アミン基、スルフヒドリル基等である。好適な結合強化部分としては、好適な（ラクチド-グリコリド）ポリマーを含むマトリックス等の末端カルボキシル基が挙げられる。当業者は適当な官能基を選択し、これらの官能基が関与する抱合反応をモニターすることができる。

上記の種類の粒状クリアリング剤を使用することにより得られる利点を以下に述べる。

ーガラクトース誘導化または電荷修飾強化法により「ミクロン」寸法範囲の粒子がRES及び肝臓に局在し、好ましくは粒子はクリアランス機能を発揮するのに十分な時間循環中に維持されるように設計できる。

ー粒子の寸法によりその中枢血管区画における保持を促進し、末梢または血管外区画への平衡化が実質的に阻止される。

ー粒子に結合するリガンドまたはアンチリガンドに所望の置換基をポリマー構造に導入できる。

ー所望の特性をもつリガンドまたはアンチリガンド-粒子結合が得られる（例えば血清ビオチニダーゼ耐性によって粒子-ビオチンクリアリング剤からのビオチン代謝物の放出が減少する）。

ー複数のリガンドまたはアンチリガンドを粒子に結合することができ、循環ターゲットティング剤-リガンドまたはアンチリガンド抱合体の最適な架橋と架橋種の有効なクリアランスを得ることができる。この利点は、貯蔵中及び *in vivo* 投与時に粒状の凝集が生じないように注意するとともに良く達成される。

動脈に挿入したタンパク性またはポリマー性のマルチループ装置によりNR-LU-13-アビジンのクリアランスを促進することもできる。ビオチンで誘導化した合成ポリマーまたはタンパク質繊維の細いループから構成されるカテーテル様装置

を主要な動脈（例えば大腿動脈）に挿入し、NR-LU-13-アビジンを捕獲する。総血液量は70秒毎に主要動脈を流れるので、in situクリアリング装置は短時間で循環NR-LU-13-アビジンを低減させるのに有効である。この装置は、NR-LU-13-アビジンがRESを介してプロセッシングされず、NR-LU-13-アビジンの除去が制御可能で測定可能であり、結合能の低下しない新しい装置を必要に応じて挿入可能であるという利点を提供する。この方法は本発明の動脈内投与を行う態様でも有用である。

インターナリゼーションを誘発せずに循環からNR-LU-13-アビジンをクリアする別の方法としては、リボソーム、IgM及び腫瘍部位に容易に透過できない寸法のその他の分子等のビオチン化高分子量分子を投与する方法がある。このようなビオチン化高分子量分子がNR-LU-13-アビジンと凝集すると、凝集複合体はRESを介して循環から容易にクリアされる。

実施例 X

アビジン架橋による治療薬インターナリゼーションの強化

多価アビジンが2個以上のビオチン分子（またはキレート-ビオチン包合体）と架橋する能力を使用して治療薬のデリバリーを改善すると有利である。より具体的には、アビジン架橋はターゲット細胞表面に架橋複合体のインターナリゼーションを誘発する。

ビオチン化NR-CO-04(リシン)を上記実施例IV.Aに記載した方法に従って調製する。ドキソルビシン-アビジン抱合体は標準的な抱合化学により調製する。ビオチン化NR-CO-04をレシピエントに投与し、循環からクリアさせる。放射免疫療法の通常の技術者であれば、ビオチン化NR-CO-04の腫瘍局在化及び循環からのクリアランスに最適な時間を容易に決定することができる。そのような時点でドキソルビシン-アビジン抱合体をレシピエントに投与する。ドキソルビシン-アビジン抱合体のアビジン部分は細胞表面上でビオチン化NR-CO-04と架橋し、複合体のインターナリゼーションを誘発する。こうしてドキソルビシンはより有効にターゲット細胞にデリバリーされる。

第1の代替的なプロトコルでは、標準的な3段階プレターゲットング方法を

使用して腫瘍ターゲット細胞への薬剤の細胞内デリバリーを強化する。前記と同様に、ビオチン化NR-LU-05に次いで（血中クリアランスのためと、ターゲット細胞結合ビオチン化抗体にサンドイッチの中間層を形成するために）アビジンを投与する。その直後のビオチン化NR-LU-05-アビジン複合体のインターナリゼーション前にメトトレキセート-ビオチン抱合体を投与する。

第2の代替的なプロトコルでは、ビオチン化NR-LU-05をさらにメトトレキセートと共有結合させる。次いでアビジンを投与して複合体のインターナリゼーションを誘発し、腫瘍ターゲット細胞への薬剤の細胞内デリバリーを強化する。

第3の代替的なプロトコルでは、NR-CD-04-アビジンをレシピエントに投与し、循環からクリアさせ、ターゲット部位に局在させる。その後、ポリビオチン化種（例えば上記実施例IV.Bに記載したようなビオチン化ポリ-L-リシン）を投与する。このプロトコルでは、デリバリーすべき薬剤を抗体-アビジン成分またはポリビオチン化種のどちらに共有結合してもよい。ポリビオチン化種は（薬剤）-抗体-アビジン-ポリビオチン-（薬剤）複合体のインターナリゼーションを誘発する。

実施例XI

2段階 *in vivo* プレターゲッティングのための ターゲッティング部分-アンチリガンド抱合体

A. SMCC誘導化ストレプトアビジンの調製

ストレプトアビジン31mg(0.48 μ mol)をPBS 9.0mlに溶解し、3.5mg/mlの最終溶液を調製した。0.5Mホウ酸バッファー(pH8.5)0.9mlを加えて溶液のpHを8.5に調整した。SMCCのDMSO溶液(3.5mg/ml)を調製し、この溶液477 μ l(4.8 μ mol)をタンパク質溶液に攪拌しながら滴下した。30分間攪拌した後、溶液をG-25(PD-10, Pharmacia, Piscataway, New Jersey)カラムクロマトグラフィーにより精製し、未反応または加水分解したSMCCを除去した。精製SMCC誘導化ストレプトアビジンを単離した(28mg, 1.67mg/ml)。

B. DTT還元NR-LU-10の調製

PBS 15.0ml中のNR-LU-10 77mg(0.42 μ mol)に0.5Mホウ酸バッファー(pH8.5)1.5mlを加えた。400mg/ml(165 μ l)のDTT溶液をタンパク質溶液に加えた。室温

で30分間攪拌後、還元抗体をG-25サイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。精製DTT還元NR-LU-10を得た(74mg, 2.17mg/ml)。

C. SMCC-ストレプトアビジンとDTT還元NR-LU-10の抱合

DTT還元NR-LU-10(63mg, 29ml, 0.42 μ mol)をPBS 44.5mlで希釈した。SMCC-ストレプトアビジンの溶液(28mg, 17ml, 0.42 μ mol)をNR-LU-10の攪拌溶液に迅速に加えた。反応混合物中の合計タンパク質濃度は1.0mg/mlであった。反応の進行をHPLC(MacModから入手可能なZorbax® GF-250)によりモニターした。約45分

後に5mMの最終濃度まで固体四チオン酸ナトリウムを加えることにより反応を停止した。

D. 抱合体の精製

小規模の反応では、HPLC Zorbax(調製用)サイズ排除クロマトグラフィーを使用して(ストレプトアビジンで)モノ置換及び/またはジ置換された抱合体を得た。所望のモノ置換及び/またはジ置換抱合体生成物は14.0~14.5分(流速3.0ml/min)で溶出し、未反応NR-LU-10は14.5~15分で溶出し、未反応誘導化ストレプトアビジンは19~20分で溶出した。

大規模な抱合反応では、DEAEイオン交換クロマトグラフィーを使用してモノ置換及び/またはジ置換付加物を単離することができる。粗抱合体混合物を濃縮後、ホウ酸ナトリウムバッファー(pH8.6)中2.5%キシリトールでカラムを溶離することにより遊離ストレプトアビジンを除去した。その後、水酸化ナトリウムでpH8.6に調整した20mMジエタノールアミン中の増加する塩勾配を使用して、結合した未反応抗体と所望の抱合体をカラムから逐次溶出させた。

E. 抱合体の特性決定

1. 小規模精製に関して上述したようにHPLCサイズ排除を実施した。
2. 非変性条件下で5%ポリアクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGE分析を実施した。評価しようとする抱合体はSDSを含むサンプルバッファー中で煮沸せず、ストレプトアビジンが15kDサブユニットに解離しないようにした。モノ及びジ置換抱合体に対応する2つの生成物のバンドがゲル上に観察された。
3. 例えば競合結合ELISAにより遊離抗体と比較した免疫反応性を評価した。得

られた値は遊離抗体の10%以内であった。

4.例えば既知量の抱合体をp-[^{125}I]-ヨードベンゾイルビオシチンで滴定することによりビオチン結合能を評価した。標識ビオシチン4当量を添加すると、ビオチン結合部位の飽和が観察された。

5.反応生成物を特性決定するためには、例えば血清クリアランスプロフィール、抱合体が抗原陽性腫瘍をターゲットする能力、抱合体の経時的腫瘍保持及びビオチン化分子が腫瘍でストレプトアビジン抱合体と結合する能力等の試験を含む in vivo試験が有用である。これらのデータによると、天然NR-LU-10完全抗体と同様の血中クリアランス特性と、天然NR-LU-10以上の腫瘍取り込み及び保持特性とを示す1:1ストレプトアビジン-NR-LU-10完全抗体が合成により形成されたことが容易に判断される。

例えば、図3は天然NR-LU-10完全抗体の対照プロフィールと比較したNR-LU-10-ストレプトアビジン抱合体(LU-10-StrAv)の腫瘍取り込みプロフィールを示す。LU-10-StrAvはストレプトアビジン成分のみで放射性標識され、LU-10-StrAvはNR-LU-10完全抗体自体と同程度に効果的にターゲット細胞に局在化することを明白に示した。

実施例XII

2段階 in vivo プレターゲットティング

実施例Iの ^{186}Re -キレート-ビオチン抱合体(Re-BT)(MW \approx 1000; 比活性=1~2 mCi/mg)と上記実施例VIIに記載したようなビオチン-ヨウ素-131小分子であるPIP-ビオシチン(PIP-BT, MW \approx 約602; 比活性=0.5~1.0 mCi/mg)を上記実施例Vに記載したように動物モデルで3段階プレターゲットティングプロトコルで試験した。Re-BTと同様に、PIP-BTはアビジンと十分に結合する能力をもち、血液から迅速にクリアされ、血清半減期は約5分間である。本明細書中に記載する2段階プレターゲットティング実験では両者分子に等価の結果が観察された。

NR-LU-10抗体(MW \approx 150kD)を(上記実施例XIに記載したように)ストレプトアビジン(MW \approx 66kD)と包含し、(上記実施例IV.AにNR-LU-10の放射性ヨウ素化について記載したように) ^{125}I /PIP-NHSで放射性標識した。実験プロトコルは以下の通

りであった。

時刻 0 NR-LU-10-StrAv抱合体200 μ gを(i.v.)注射。

24～48時間後 60～70倍モル過剰の放射性標識ビオチニル分子を(i.v.)注射。

放射性標識ビオチニル分子の注射から2、6、24、72、120時間後に生体分布試験を実施した。

NR-LU-10-ストレプトアビジンはLS-180動物モデルで血中クリアランスと腫瘍取り込みの非常に安定したパターンを示した。代表的プロフィールを図4に示す。LU-10-StrAv抱合体をターゲット細胞部位に少なくとも24時間局在化させた後にPIP-BTまたはRe-BTを投与すると、治療用放射性核種の腫瘍取り込みは絶対量及び迅速さの両者とも高い。LU-10-StrAv(I-125)投与から37時間後にPIP-BTを投与すると、腫瘍取り込みは40時間の時点で500pMOL/Gを上回り、LU-10-StrAv投与から45時間後に約700pMOL/Gのピークに達した。

このように抗体ターゲティング部分と同等の化学量論量の小分子治療薬が腫瘍にほぼ瞬時に取り込まれるので、治療用放射性核種をその最高比活性で容易に利用できる。また、LU-10-StrAv抱合体に結合していない放射性核種が迅速にクリアされるので、直接標識した抗体抱合体で観察される緩慢な腫瘍蓄積相を排除することにより、ターゲティング比(腫瘍：血液)を増加することができる。放射性核種腫瘍保持のパターンは完全抗体のパターンであり、非常に安定している。

2段階プレターゲティング法と漸減モル用量の放射性標識ビオチニル分子を使用する実験も実施した。キャリアを加えない(高比活性)用量の放射性標識ビオチニル分子で約20%ID/Gの取り込み値に達した。飽和用量未満で循環LU-10-StrAvが血液区画内で有意量の投与放射性標識ビオチニル分子と結合するのが観察された。

実施例XIII

アシアロオロソムコイドクリアリング剤及び2段階プレターゲティング

ターゲティング比(腫瘍：血液)を最大にするために、ターゲット部位におけるリガンド結合能を悪化せずにターゲティング部分-アンチリガンド抱合体(例えばLU-10-StrAv)の血液プールをクリアすることが可能なクリアリング剤を探し

た。このような物質として、循環LU-10-StrAvと抱合するためにアビジン-ビオチン相互作用を利用するビオチン化アシアロオロソムコイドを試験した。

A. オロソムコイドの誘導化

160mM NaClを含有する0.1M酢酸ナトリウムバッファー(pH5.5)3.5mlにヒトオロソムコイド(Sigma N-9885)10mgを溶解した。脱イオン(D.I.)水中の2%(w/v)CaCl₂溶液70 μ lを加え、4.6U/mlノイラミニダーゼ(Sigma N-7885)11 μ lを加えた。

混合物を37℃で2時間インキュベートし、サンプル全体をCentricon-10®限外濾

過装置(Amicon, Danvers, Massachusetts から入手可能)でPBS 2容量と交換した。上記実施例IVに記載したようにPIP技術を用いてアシアロオロソムコイド及びオロソムコイド出発物質をI-125 で放射性標識した。

2種の放射性標識調製物を雌BALB/cマウス(20~25g)にi.v.(静脈)注射し、投与から5分、10分、15分、30分、1時間、2時間及び4時間後に各群3匹のマウスの眼窩後方で逐次放血させることにより血中クリアランスを評価した。この実験の結果を図5に示すが、アシアロオロソムコイドはそのオロソムコイド対応物よりも迅速にクリアする。

さらに、各化合物を投与した2匹の動物を投与から5分後に屠殺し、制限的に生体分布させた。これらの結果を図6に示す。これらのデータの最も顕著な特徴は、血中濃度の差(オロソムコイドの78%に対してアシアロオロソムコイドの0.4%)と、他の組織に対する肝臓(86%)中のアシアロオロソムコイド取り込みの特異性である。

B. アシアロオロソムコイドクリアリング剤及びオロソムコイド対照のビオチン化

0.2M炭酸ナトリウムバッファー(pH9.2)100 μ lをPIP-125標識オロソムコイド2mg(PBS 1.00ml中)とPIP-125標識アシアロオロソムコイド2mgに加えた。次にNHS-アミノカプロン酸ビオチンの1.85mg/ml DMSO溶液60 μ lを各化合物に加えた。反応混合物を攪拌し、室温で45分間放置した。反応混合物をサイズ排除カラムクロマトグラフィー(PD-10, Pharmacia)により精製し、PBSで溶出した。1.2ml分画を取り出したところ、分画4及び5は照射した放射能の大部分(>95%)を含んでい

た。ストレプトアビジン-アガロースビーズ (Sigma S-1638) またはペレット

をPBSで洗浄し、各ビオチン化放射性標識タンパク質 $20\mu\text{g}$ をビーズ $400\mu\text{l}$ 及び PBS $400\mu\text{l}$ に加え、20秒間攪拌し、 $14,000\text{rpm}$ で5分間遠心分離した。上清を取り出し、ペレットをPBS $400\mu\text{l}$ で洗浄した。この洗浄手順をさらに2回繰り返し、上清をあわせて線量計に入れ、それぞれのペレットに対して定量した。値を下表4に示す。

表4

化合物	上清	ペレット
オロソムコイド	90%	10%
ビオチン-オロソムコイド	7.7%	92.0%
アシアロオロソムコイド	92%	8.0%
ビオチン-アシアロオロソムコイド	10%	90%

C. タンパク質-ストレプトアビジン *in vivo* 結合

ビオチン-アシアロオロソムコイドが循環LU-10-StrAv抱合体と *in vivo* 結合して該抱合体を血液中から除去する能力を評価した。雌BALB/cマウス (20~25g) にLU-10-StrAv抱合体 $200\mu\text{g}$ を *i.v.* 注射した。抱合体投与から25時間後にクリアリング剤 ($200\mu\text{l}$ PBS - グループ1; $400\mu\text{g}$ 非ビオチン化アシアロオロソムコイド - グループ2; $400\mu\text{g}$ ビオチン化アシアロオロソムコイド - グループ3; $200\mu\text{g}$ ビオチン化アシアロオロソムコイド - グループ4) を投与した。第5のグループには、ビオチンを注射する前に飽和させておいたPIP-I-131-LU-10-StrAv抱合体を投与した (グループ5)。 $400\mu\text{g}$ 用量はLU-10-StrAv抱合体の初期用量の10:1モル倍のクリアリング剤に相当し、 $200\mu\text{g}$ 用量は5:1モル倍に相当した。飽和PIP-I-131-LU-10-StrAv抱合体は、LU-10-StrAv 2mg に10倍モル過剰のD-ビオチンを加えて生成した後、G-25 PD-10カラムでサイズ排除精製した。

各群から3匹のマウスを0.17、1、4及び25時間後 (クリアリング剤注射前) と27、28、47、70及び90時間後に上述のように逐次放血させた。各群から別の2匹の動物をクリアリング剤投与から2時間後に屠殺し、制限的な生体分布をさせた。

血中クリアランスデータを図7に示す。これらのデータは、グループ3及び4の循環LU-10-StrAv放射能が対照グループ1、2及び5で得た値に比較して迅速且つ有意に低下したことを示す。循環抗体-ストレプトアビジン抱合体の絶対減少率は対照に比較して約75%であった。

生体分布データを図8に表形式で示す。生体分布データは、肝臓、腎臓及び腸を除く全組織でグループ3及び4の抱合体の濃度の低下を示し、これはビオチン化アシアロオロソムコイドと複合体化後に抱合体に結合した放射性標識の分解及び排泄に一致する。

さらに、(血清+PBS中で実施したアッセイで)心臓穿刺により血清サンプルから残留循環抱合体を得、血清中に残存する機能的ストレプトアビジンの指標であるビオチン(アガロースビーズに固定化したビオチン)と結合する能力を分析した。グループ1動物血清は固定化ビオチンに約80%結合した抱合体放射性標識を示した。(クリアリング剤投与から2時間後に)残留している注射用量百分率に固定化ビオチンと結合することが可能な残留百分率(残留機能的抱合体の量)を乗じることにより残留循環放射性標識値を補正すると、図9に示すグラフが得られる。ビオチン化アシアロオロソムコイド200 μ gを投与すると、血清ビオチン結合能は50分の1に減少し、腫瘍動物での予備試験で架橋は示されず、予備局在化LU-10-StrAv抱合体は腫瘍から除去されなかった。ターゲット細胞部位におけるビオチン結合能を低下させずに循環ターゲティング部分-アンチリガンドを除去すると共に、ターゲティング部分-アンチリガンドの投与量の増加により腫瘍への放射線量が増加することにより、従来の放射免疫療法を使用して通常達せられるよりも腫瘍への絶対放射線量が増加すると同時に非腫瘍細胞への毒性が低下する。

次に低用量のアシアロオロソムコイド-ビオチンを評価する実験を実施した。同一動物モデルにLU-10-StrAv抱合体の投与から24時間後に用量50、20及び10 μ gのアシアロオロソムコイド-ビオチンを注射した。順次放血させた動物からのデータを図10に示し、クリアリング剤投与から2時間後に屠殺した動物からのデータをそれぞれ図11A(血中クリアランス)及び11B(血清ビオチン結合)に示す。50及び20 μ gの用量のアシアロオロソムコイド-ビオチンは循環LU-10-StrAv抱

合体濃度を有効に約65%低下させ(図11A)、固定化ビオチンとの結合の補正後では、ビオチン結合能をもつ循環中に注射用量の3%しか残存しなかったが、対照動物では注射量の約25%が残留した(図11B)。(循環LU-10-StrAv抱合体に対して1:1の化学量論量に達する)低用量であっても、アシアロオロソムコイド-ビオチンはビオチン-アビジン相互作用に依存する *in vivo* 結合により循環ストレプトアビジン含有抱合体の血中濃度を低下させるのに非常に有効であった。

実施例XIV

PIP-ビオシチンの腫瘍取り込み

上記実施例VIIに記載したように調製したPIP-ビオシチンを試験し、その *in vivo* での行方を判定した。以下のデータは、上記実施例XIに記載したようにI-125標識NR-LU-10-ストレプトアビジン抱合体200 μ g(950pmol)を時刻0で投与した腫瘍ヌードマウス(試験の7日前に100mg LS-180腫瘍異種移植片を皮下移植)での実験に基づく。24時間後にマウスにPIP-I-131-ビオシチン(40 μ Ci)と、42 μ g(69,767pmol)、21 μ g(34,884pmol)、5.7 μ g(9468pmol)、2.85 μ g(4734pmol)または0.5 μ g(830pmol)の用量に対応する量の冷キャリアPIP-I-127-ビオシチンをi.v.注射した。PIP-ビオシチン注射から4時間後に腫瘍を切除し、放射能を計数した。

多いほうから3種の用量は約600pmol/gのPIP-ビオシチン腫瘍局在化を生じた。多いほうから2種の用量を投与した組織で組織分析を行ったところ、腫瘍結合ストレプトアビジンの飽和に達したことが判明した。5.7 μ gの用量で観察された同等の腫瘍局在化もストレプトアビジン飽和を示している。他方、少ないほうから2種の用量ではNR-LU-10-ストレプトアビジン抱合体の局在化は同等である(全グループの腫瘍は抱合体について平均約40%ID/Gであった)にも拘わらず、PIP-ビオシチンの絶対腫瘍局在が低かった。

最低用量グループ(0.5 μ g)はPIP-I-131-ビオシチンの高効率腫瘍デリバリーを示し、効率は経時的に増加した。120時間の時点(PIP-ビオシチン投与から96時間後)で85.0% ID/Gのピーク取り込みが観察された。また、%IDで表したPIP-ビオシチンの絶対量も全サンプル抽出時点にわたって腫瘍中で連続的に増加した。

168時間の時点で% ID/Gで表した取り込みが減少したのは、120時間と168時間の

時点の間で腫瘍が有意に増殖したためであった。

さらに、同一の腫瘍に時間的に間隔を置いて順次投与したNR-LU-10-ストレプトアビジン抱合体(LU-10-StrAv)とPIP-ビオシチンの同時の局在化を試験した。PIP-ビオシチンによる腫瘍における放射能の局在化は、抗体-ストレプトアビジン抱合体(LU-10-StrAv)と異なる取り込み及び保持パターンを示した。LU-10-StrAvは天然NR-LU-10抗体の組織試験と等価の特徴的腫瘍取り込みパターンを示し、投与後24～48時間で40% ID/Gのピーク値に達した。これに対して、PIP-ビオシチンは腫瘍での迅速な初期蓄積を示し、PIP-ビオシチン投与後24時間までにLU-10-StrAvの場合よりも高い濃度に達した。さらに、抱合体に結合した放射能の濃度が減少し始めると、PIP-ビオシチンの局在化は96時間まで増加し続けた。これらの時点で循環PIP-ビオシチンの量がLU-10-StrAvよりも僅かに多いことはこの現象を説明するのは不十分なようであった。

腫瘍中のPIP-ビオシチン対LU-10-StrAvの比は実験の間増加し続けたが、血中比は減少し続けた。この結果は、血液から腫瘍へのターゲティング部分含有抱合体(とこれに結合したPIP-ビオシチン)の連続的な結合と、それに続くPIP-ビオシチン及び抱合体の異なる分解プロセスに一致する。(ターゲティング部分に結合した放射性標識に比較して)ストレプトアビジン抱合体成分に結合した放射性標識は代謝分解の器官で増加した保持を示したので、ストレプトアビジンに結合したPIP-ビオシチンは腫瘍細胞により選択的に保持されると思われる。放射性標識はターゲット細胞部位に保持されるので、これらの部位に放射能がより多量に蓄積する。

PIP-ビオシチンの AUC_{tumor}/AUC_{blood} は抱合体の2倍を上回る(1.95に対して4.27であり、ここでAUCは「曲線下面積」を意味する)。さらに、PIP-ビオシチンの絶対 AUC_{tumor} は抱合体のほぼ2倍である(4629に対して9220)。この結果、腫瘍への放射線量の増加が達せられた。

実施例XVI

クリアリング剤評価実験

下記実験中、腫瘍をもたないマウスの実験は、雌BALB/cマウス(20～25g)を用

いて実施した。腫瘍をもつマウスの実験は、雌ヌードマウスにLS-180腫瘍細胞を皮下注射し、7日後にマウスは50～100mg腫瘍異種移植片を示した。これらの実験で使用したモノクローナル抗体はNR-LU-10であった。NR-LU-10-ストレプトアビジン抱合体を放射性標識した場合には、本明細書に記載の手順を使用してI-125で放射性標識した。PIP-ビオチンを放射性標識した場合には、本明細書に記載の手順を使用してI-131又はI-125で放射性標識した。

A. 後に投与する放射性標識ビオチンリガンドからの循環放射能を低下させることにおけるアシアロオロソムコイド-ビオチン(AO-Bt)の有用性

LS-180結腸腫瘍異種移植片をもつマウスにNR-LU-10抗体-ストレプトアビジン(MAb-StrAv)抱合体200 μ gを時刻0で注射し、腫瘍に22時間予備局在化させた。この時点でAO-Bt 20 μ gを1群の動物に投与した。2時間後に放射性同位体を有し、リガンドを含む小分子(本実施例Bに記載するように調製したPIP-ビオチン-デキストラン)90 μ gを前記マウス群とAO-Btを投与しなかった1群に投与した。放射性標識の腫瘍取り込みと血液からのクリアランスに関するこの実験の結果、血中クリアランスが強化される一方で放射性標識ビオチンを含む抱合体の腫瘍ターゲティングは維持され、ターゲットへのデリバリー量/血清中の局在量を全体として改善できることが判明した。クリアリング剤を用いた場合の AUC_{tumor}/AUC_{blood} は6.87であったが、クリアリング剤を用いない場合の AUC_{tumor}/AUC_{blood} は4.45であった。循環MAb-StrAv抱合体の血中クリアランスはクリアリング剤を使用することによって強化された。別の動物群でクリアリング剤を放射性標識したところ、非常に低濃度(合計488pmolの用量で1.7pmol/g(0.35%ID/g))でしか腫瘍と直接結合せず、腫瘍と結合したMAb-StrAvが後に投与する放射性標識リガンドと結合する能力をさほど悪化させないことが判明した。

B. PIP-ビオチン-デキストランの調製プロトコル

Wilbur et al., J. Nucl. Med., 30:216-226, 1989に従って調製したN-スクシンイミジルp-I-125-ヨードベンゾエートの乾燥残渣(1.87mCi)にPBS 0.3ml及び1M炭酸ナトリウム(pH9.25)0.15ml中のビオチン-デキストランリシン固定剤(BDLF, Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouriより入手可能、分子量70,000ダルト

ン、約18ビオチン/分子)3.0mgの溶液を加えた。

C. A0-Btの用量最適化

上記のようにStrAv-MAbを投与した腫瘍マウスに用量を増加させながらA0-Btを注射した(0 μ g、20 μ g、50 μ g、100 μ g及び200 μ g)。¹I-131-PIP-ビオシチン(A0-Bt投与から2時間後に5.7 μ g投与)の腫瘍取り込みを試験した。A0-Btの用量の増加はMAb-StrAvの腫瘍局在化に何ら影響を与えなかった。A0-Bt投与から44時間後に得られたデータは、効果が同様に失われたことを示した。このデータは、ビオチン化抗体後にアビジンを投与した場合に認められたように、A0-Bt用量が腫瘍表面でMAb-StrAvと架橋せず、インターナリゼーションを生じないことを示す。

A0-Btの用量が高いと、PIP-ビオシチン腫瘍局在化は抑制された。この効果はA0-Btを誘導化するために使用したビオチンの再分解と腫瘍への分布に起因する可能性が最も高い。最適な腫瘍対血液比(腫瘍重量1g当たりの放射性標識リガンドの注射用量%を血液重量1g当たりの放射性リガンドの注射用量%で除した値)は50 μ gのA0-Bt用量で達せられた。50 μ g A0-Bt用量を使用するプロトコルの完了後に実施した生体分布の結果、放射性標識は全ての非ターゲット組織中で低濃度に保たれることが判明した(血中1.2pmol/g;尾中3.5pmol/g;肺中1.0pmol/g;肝臓中2.2pmol/g;脾臓中1.0pmol/g;胃中7.0pmol/g;腎臓中2.7pmol/g;及び腸中7.7pmol/g)。腫瘍中では99.3pmol/gであるので、これらの結果は腫瘍以外の全部位でPIP-ビオシチン生体分布がMAb-StrAv生体分布から有効に分離されることを示す。この分離は50 μ g過剰の全クリアリング剤投与量でも生じた。PIP-ビオシチンの腫瘍局在化の低下は、50 μ g過剰のクリアリング剤投与量の投与の有意な結果であった。さらに、投与から44時間後の非ターゲット組織中のPIP-ビオシチンの量はPIP-ビオシチン単独投与による局在化と同様であり(但し腫瘍ではPIP-ビオシチンを単独投与した場合には僅かな蓄積が認められた)、有効な分離を示した。

D. 最適なクリアリング剤用量についての別の検討

腫瘍を有するマウスに上記のように時刻0でMAb-StrAvを投与し、22時間後にA0-Bt 50 μ g、25時間後にI-131-PIP-ビオシチン545 μ Ciを投与した。全身放射能を測定し、クリアリング剤を投与しなかった動物と比較した。A0-Bt 50 μ gは、循

環MAb-StrAv抱合体と結合することにより妨害されない動物から注射放射能をクリアするのに有効であった。I-131-PIP-ビオチンの腫瘍取り込みは $50\mu\text{g}$ のクリアリング剤用量で維持され、 $\text{AUC}_{\text{tumor}}/\text{AUC}_{\text{blood}}$ は30:1であり、このモデルを使用して従来の抗体-放射性同位体療法で得られる $\text{AUC}_{\text{tumor}}/\text{AUC}_{\text{blood}}$ の約15倍良好であった。

E. ヒト血清アルブミン(HSA)のガラクトース及びビオチン誘導化

安価且つ非免疫原性であるという利点を示すことからHSAを評価した。AOに関して上述したのと同様の化学により、ビオチン濃度を変えて(1~約9ビオチン/分子)HSAを誘導化した。より具体的には、Sigma Chemical Co.から入手可能なHSAの溶液(PBS中5~10mg/ml)に10% v/v 0.5M硼酸ナトリウムバッファー(pH8.5)を加えた後、NHS-LC-ビオチン(Sigma Chemical Co.)のDMSO溶液を所望のモル供給比(反応体の相対モル当量)で攪拌溶液に滴下した。反応混合物中の最終DMSO百分率は5%を越えるべきでない。室温で1時間攪拌後、反応は完了した。HSA上へのビオチンの取り込み効率90%が一般に観察された。従って、LC-ビオチンのNHSエステル3モル当量を導入した場合には、約2.7ビオチン/HSA分子が得られた。G-25サイズ排除クロマトグラフィーを用いてビオチン誘導化HSAから未反応ビオチン試薬を除去した。あるいは、粗生成物を直接ガラクトシル化してもよい。予めビオチン化されていないデキストランをビオチン化する場合にも同一の化学を適用できる。

次に12~15ガラクトース/分子でHSA-ビオチンを誘導化した。ビオチン化HSAのガラクトース誘導化は、Lee, et al., *Biochemistry*, 15: 3956, 1976の手順に従って実施した。より具体的には、シアノメチル-2,3,4,6-テトラ-O-アセチル-1-チオ-D-ガラクトピラノシドの0.1Mメタノール溶液を調製し、メタノール中10%v/v 0.1M NaOMeと12時間反応させ、反応性ガラクトシルチオイミデートを生成した。ビオチン化HSAのガラクトシル化は、300倍モル過剰の反応性チオ

イミデートからの無水メタノールを最初に蒸発させることにより開始した。10%v/v 0.5M硼酸ナトリウムで緩衝したPBS中のビオチン化HSAを油状残渣に加えた。室温で2時間攪拌後、混合物を4℃で12時間保存した。次にガラクトシル化HSA-ビ

オチンをG-25サイズ排除クロマトグラフィーまたはバッファー交換により精製し、所望の生成物を得た。デキストランのガラクトシル化にも同一の化学が利用可能である。HSA上へのガラクトースの取り込み効率は約10%である。

24時間前にStrAv-MAb 200 μ gまたはPBS 200 μ lを予め投与しておいたマウスに12～15のガラクトース残基と9個のビオチンを含むガラクトース-HSA-ビオチン(G-HSA-B)70 μ gを投与した。その結果、G-HSA-BはStrAv-MAbを循環から除去するのに有効であることが判明した。また、G-HSA-Bの薬剤動力学は循環MAb-StrAvの有無を問わず攪乱されず且つ迅速である。

F. 非タンパク性クリアリング剤

約18ビオチン/分子で予め誘導化し且つ同数の遊離1級アミンを有する分子量70,000ダルトンの市販される形態のデキストランを試験した。1級アミン部分は、HSAをベースとするクリアリング剤について上述した手順に実質的に従って約9ガラクトース/分子の濃度でガラクトシル化試薬で誘導化した。ガラクトース対HSAのモル当量供給比は約300:1であり、ガラクトースの約3分の1が活性形態に変換された。次に、24時間前にMAb-StrAv抱合体200 μ gを静脈内投与しておいた1群のマウスにガラクトース-デキストラン-ビオチン(GAL-DEX-BT)40 μ gをi.v.注射し、別の同様の群のマウスにGAL-DEX-BT 80 μ gを注射した。GAL-DEX-BTはStrAv-MAb抱合体を迅速且つ有効にクリアし、クリアリング剤投与から4時間未満で循環抱合体の66%を越える量を除去した。存在する循環StrAv抱合体の化学量論量の1.6倍(40 μ g)及び3.2倍(80 μ g)に対応するクリアリング剤用量の両方で同等の効果が観察された。

G. G-HSA-Bクリアリング剤の用量変動

MAb-StrAv抱合体200 μ gを投与し、24時間後にクリアリング剤を投与し、2時間後にPIP-ビオシチン5.7 μ gを投与するという基本フォーマットに従って用量変動試験を行った。

用量変動試験はG-HSA-Bクリアリング剤を用いて実施し、9ビオチン/分子及び12～15ガラクトース残基/分子の負荷から開始した。MAb-StrAv抱合体200 μ g用量投与から24時間後に20、40、70及び120 μ gの用量を投与した。クリアリング

剤投与から2時間後にI-131-PIP-ビオチン $5.7\mu\text{g}$ を投与した。PIP-ビオチンの腫瘍取り込み及び血液保持をその投与から44時間後(クリアリング剤投与から46時間後)に調べた。その結果、G-HSA-Bを投与することにより $40\mu\text{g}$ 以上の全ての用量でPIP-ビオチンの血中保持の最下点が達成されることが判明した。他方、各G-HSA-B用量が増加するにつれてPIP-ビオチンの腫瘍結合が明らかに用量依存的に低下した。MAb-StrAv抱合体の腫瘍局在化に影響を及ぼす用量依存性効果は観察されなかったため、このデータは代謝されたクリアリング剤からのビオチンの放出により腫瘍と結合したMAb-StrAv抱合体が比較的により高度に阻止されることを示すと解釈された。腫瘍/血液比のプロットに関してアシアロオロソムコイドクリアリング剤について上述したのと同様の結果がG-HSA-Bでも認められ、約 $40\mu\text{g}$ 用量で血中クリアランスと腫瘍保持の間の最適なバランスが生じた。

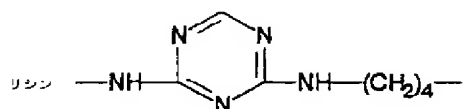
このクリアリング剤により放出可能なビオチンのモル量は高用量時に比較的大きいので、クリアリング剤の有効性に及ぼすビオチン化の低レベルの効果を評価する試験を行った。9、5または2ビオチン/分子で誘導化したG-HSA-Bはクリアリング剤の同一のタンパク質用量でMAb-StrAv抱合体を血液からクリアすることができた。全レベルのビオチン化でMAb-StrAvの有効で迅速な血液からのクリアランスが生じた。

腫瘍を有するマウスで $60\mu\text{g}$ 用量の各クリアリング剤を用いて、これらの9、5及び2ビオチンで誘導化したクリアリング剤と単一ビオチンG-HSA-Bクリアリング剤との比較を行った。この実験の結果、各クリアリング剤はクリアリング剤投与から2時間後にMAb-StrAv抱合体の血中クリアランス及び腫瘍保持に実質的に同等に有効であることが判明した。単一ビオチンを含むG-HSA-Bを、PIP-ビオチンの予備局在化されたMAb-StrAv抱合体との腫瘍結合を維持しながら血液中で後で投与されるビオチン化小分子(PIP-ビオチン)の結合を低下する能力について試験した。PIP-ビオチン投与から44時間後に測定したところ、MAb-StrAv抱合体とPIP-ビオチンの両者の腫瘍局在化は広い用量範囲($90\sim 180\mu$

g)にわたって1ビオチン/分子を含むG-HSA-Bにより良好に維持された。単一ビオチンG-HSA-Bクリアリング剤の用量を増加することにより、腫瘍局在をほぼ一定

に維持しながらPIP-ビオチンの血中保持の漸減が達せられ、このクリアリング剤はビオチン化レベルが低いものが好適であることが判明した。好適であるのは、単一ビオチンG-HSA-Bクリアリング剤が広い用量範囲にわたってMAB-StrAvをクリアするのに有効であり（患者毎に最適用量を滴定する必要を排除する可能性を有する）、全身の循環に放出される競合ビオチンが高ビオチン負荷レベルの同じクリアリング剤よりも少ないと思われることによる。

クリアリング剤から放出されるビオチンが、活性剤-ビオチン抱合体の予備局在化ターゲティング部分-ストレプトアビジン抱合体に対する結合に及ぼす効果を低下させる別の方法は、保持リンカーを用いてタンパク質またはポリマーまたは他の主要クリアリング剤成分をビオチンに結合することである。保持リンカーは、ペプチド結合を開裂する物質に対して耐性を示す化学構造を有し、場合によってはリソソームなどの代謝空間に存在するとプロトン化される。本発明の好適な保持リンカーは上記特徴の両者を有するD-アミノ酸の短鎖または小分子である。本発明の保持リンカーの例は塩化シアヌルであり、これはタンパク質主要クリアリング剤成分のリシンのεアミノ基と、（上述の）還元され化学的に修飾されたビオチンカルボキシ部分のアミン部分との間に挿入され、下記構造：



の化合物を形成することができる。上記化合物が代謝空間で代謝されると、複素環はプロトン化される。環プロトン化により代謝物はリソソームから出られなくなる。こうして複素環を含むビオチン代謝物は代謝部位に限定されるので、予備局在化されたターゲティング部分-ストレプトアビジンターゲット部位に関して活性剤-ビオチン抱合体と競合しない。

G-HSA-B用量変動試験で観察された放射性標識PIP-ビオチンの腫瘍／血液局

在化を比較した結果、広い用量範囲(90～180μg)にわたって最適な腫瘍対バックグラウンドターゲティングが達せられることが判明し、その結果、クリアリング剤用量が多くても有効であると予想された。用量変動実験の別の重要な結果は、

1分子当たり平均1個しかビオチンをもたないG-HSA-Bがアシュウェルレセプターメカニズムを介してのみMAB-StrAv抱合体をクリアすると推測されることであり、これはMAB-StrAv抱合体とクリアリング剤の架橋及び凝集を生じるにはビオチンが少なすぎることによる。このような凝集体は細網内皮系により除去される。

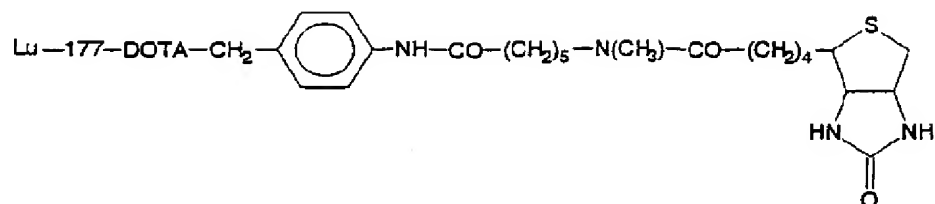
H.G-HSA-Bを用いた腫瘍ターゲティング評価

この実験のプロトコルは以下の通りであった。

時刻0: MAB-StrAv抱合体の400 μ gを投与し、

24時間後: 1ビオチン及び12~15ガラクトースを含むG-HSA-B 240 μ gを投与し、

26時間後:



の6 μ gを投与する。Lu-177は公知の方法を用いてDOTAキレートと錯化され、かつDOTAは以下の手順により調製される。N-メチルグリシン（慣用名サルコシン、Sigma chemical Co.から入手可能）をビオチン-NHSエステルとDMF及びトリエチルアミン中で縮合してN-メチルグリシルビオチンを得た。N-メチルグリシルビオチンは次いでEDCI及びNHSで活性化した。得られたNHSエステルは単離せず、その場で公知の方法（例えば、McMurry et al., Bioconjugate Chem., 3: 108-117, 1992）で調製可能なDOTA-アニリン及び過剰のピリジンと縮合した。反応溶液は60℃10分間加熱し、次いでエバポレートした。残渣は分取HPLCで精製して[(N-メチル-N-ビオチニル)-N-グリシル]-アミノベンジル-DOTAを得た。

1. (N-メチルグリシル)ビオチンの調製

DMF(8.0ml)及びトリエチルアミン(0.61ml, 4.35mmol)を固体のN-メチルグリシン(182mg, 2.05mmol)及びN-ヒドロキシースクシンイミジルビオチン(500mg,

1.46mmol)に添加した。混合物を油浴上で85℃で1時間加熱し、その間固体は溶解して無色透明の溶液となった。溶媒は次いでエバポレートした。黄色油残渣は

水酢酸で酸性化し、エバポレートしかつ30% MeOH/ETOAc 1% HOAcで溶出する50gシリカを充填した27mmカラム上でクロマトグラフィーにかけ、収率66%で白色固体(383mg)として生成物を得た。

H-NMR(DMSO): 1.18-1.25(m, 6H, $(\text{CH}_2)_3$), 2.15, 2.35(2t's, 2H, CH_2CO), 2.75(m, 2H, SCH_2), 2.80, 3.00(2s's, 3H, NCH_3), 3.05-3.15(m, 1H, SCH), 3.95, 4.05(2s's, 2H, CH_2N), 4.15, 4.32(2m's, 2H, 2CHN's), 6.35(s, NH), 6.45(s, NH)

2. [(N-メチル-N-ビオチニル)グリシル]-アミノベンジル-DOTA の調製

N-ヒドロキシスクシンイミド(10mg, 0.08mmol)及びEDCI(15mg, 6.08mmol)を(N-メチルグリシル)ビオチンのDMF(1.0ml)溶液に添加した。この溶液は23℃で64時間攪拌した。ピリジン(0.8ml)とアミノベンジル-DOTA(20mg, 0.04mmol)を加えた。この混合物を油浴上で63℃で10分間加熱し、次いで23℃で4時間攪拌した。溶液をエバポレートした。残渣は分取HPLCで精製して27%の収率で白色固体(8mg, 0.01mmol)として生成物を得た。

H-NMR(D_2O): 1.30-1.80(m, 6H), 2.40, 2.55(2t's, 2H, CH_2CO), 2.70-4.2(コンプレックス多重項), 4.35(m, CHN), 4.55(m, CHN), 7.30(m, 2H, ベンゼン水素), 7.40(m, 2H, ベンゼン水素)

腫瘍1g当たり20~25%の注射用量でLu-177-DOTA-ビオチン小分子の有効なデリバリーが観察された。これらの値はMAb-StrAv抱合体のデリバリー効率と同等である。この非最適化クリアリング剤用量で得られた $\text{AUC}_{\text{tumor}}/\text{AUC}_{\text{blood}}$ は匹敵する直接のMAb-放射性標識投与で得られる値の300%であった。次の実験は、匹敵する従来のMAb-放射性標識投与で得られる値の1000%より大きい $\text{AUC}_{\text{tumor}}/\text{AUC}_{\text{blood}}$ を与えた。さらに、HSAをベースとするクリアリング剤はヒトにおいて低い免疫原性の程度を示すと予想される。

実施例 XVI

パリトキシシン含有包合体

A. パリトキシシン-モノ-オキシアセチル-LC-ビオチン。

トリクロロエチル カルバメート-NH-パリトキシシン(troc-NH-パリトキシシン)。

パラトキシシン（ハワイ・バイオテクノロジー・グループ社、アイエア、ハワイ）のピリジン溶液にトリクロロエチル-クロロフォーマート（アルドリッチ・ケミカル社、ミルウォーキー、ウィスコンシン）を添加する。この溶液を23℃で6時間攪拌した後、溶媒を減圧下でエバレートする。残渣を水に溶解し、CH₂Cl₂で洗浄する。水画分を凍結乾燥し、生成物をCM-セファデックスD-25クロマトグラフィーで精製する。

（トリクロロエチル カルバメート (Troc)-NH-パリトキシシン- オキシアセチル-LC-ビオチン。troc-NH-パリトキシシンのDMF 溶液に1.0 当量の水素化ナトリウムを添加し、さらに1.0 当量のヨードアセチル-LC-ビオチンを加える。この懸濁液を23℃で24時間攪拌した後、水を加えて反応を停止する。0.1M HCl を加えてpHを7 に調節し、trocを脱保護すると（リン酸緩衝液（pH5.5）を用いた水性THF中の亜鉛使用）最終生成物を与える。

B. パラトキシシン- モノ- オキソ-N- アセトアミド- エチルジアミン-N' - (N-メチル)-グリシル- ビオチン。

N-メチル-グリシル- ビオチン。DMFおよびトリエチルアミン中、N-メチル-グリシン（慣用名ザルコシン、シグマ・ケミカル社）をビオチン-NHSエステルと縮合し、N-メチル-グリシル- ビオチンを得る。

より詳しく言うと、DMF(8.0ml)およびトリエチルアミン(0.61ml、4.35mmol)を固体のN-メチル-グリシン(182mg、2.05mmol)およびN-ヒドロキシ-スクシンイミジル-ビオチン(500mg、1.46mmol)に添加した。この混合物を固体が溶解し無色透明の溶液になるまで85℃のオイルバスで1時間加熱した。その後、溶媒をエバポレートした。黄色の油状残渣を氷酢酸で酸性とし、エバポレート後、50gのシリカを27mmの高さに充填したカラムと溶出液30% MeOH/EtOAc 1% HOAcを用いたクロマトグラフィーで精製し、収率66%(383 mg)で白色固体の生成物を得た。

H-NMR(DMSO): 1.18-1.25(m, 6H, (CH₂)₃), 2.15, 2.35(2 t's, 2H, CH₂CO), 2.75(m, 2H, SCH₂), 2.80, 3.00(2 s's, 3H, NCH₃), 3.05-3.15(m, 1H, SCH), 3.95, 4.05(2 s's, 2H, CH₂N), 4.15, 4.32(2 m's, 2H, 2CHN's), 6.35(s, NH), 6.45

(s, NH)

パリトキシシン-モノ-オキソ-N-アセトアミド-エチルジアミン-N'-(N-メチル)-グリシル-ビオチン。N-メチル-グリシル-ビオチンはガス状HClを含む還流メタノール中でエステル化するとメチルエステル、メチル-(N-メチル)グリシル-ビオチンを与える。このメチルエステルをエチレン・ジアミンに溶解し、23℃で14時間攪拌すると、ビオチニル-N-メチル-グリシル-エチレンジアミンモノアミドを与える。溶媒(エチレンジアミン)を減圧下でエバレートする。トリエチルアミンを含むDMF中、ビオチニル-N-メチル-グリシル-エチレンジアミンモノアミドのアミノ基をN-ヒドロキシスクシンイミジルヨードアセテート(アルドリッチ社製のヨード酢酸、N-ヒドロキシスクシンイミドおよびジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)で調製したもの)でアシル化し、アシル化ヨード化ビオチン誘導体を生成する。上述のように調製したTroc-NH-パリトキシシンを1.0当量の水素化ナトリウムで脱プロトン化し、ヨード-ビオチン誘導体、N-(ヨードアセチル)-エチレンジアミン-N'-(N-メチル)グリシルビオチンでO-アルキル化してエステル、N-(トリクロロエトキシカルボニル)-パリトキシシン-モノ-オキソ-N-アセトアミド-エチレンジアミン-N'-(N-メチル)グリシルビオチンを生成する。このエステルのトリクロロ-カルバメート基はpH5.5-7.2の水性THF中の亜鉛で切断し最終生成物を与える。

C. カルボキシ-遊離型パリトキシシン-N(Me)-グリシル-ビオチン。

Troc-アミン保護型パリトキシシン(troc-NH-パリトキシシン)の2つのアミド結合をpH7.1、37℃の温和な条件下でアミド結合を選択的に切断する化合物であるペプチダーゼ(シグマ・ケミカル社から入手可能)で切断し、遊離したカルボキシ基を有するパリトキシシン分子を得る。この生成物を分取型HPLC-逆相C-18クロマトグラフィーで精製する。遊離型のカルボキシ基をEDCIで活性化しビオチニル-N-メチル-グリシル-エチレンジアミンモノアミドと結合し、N-(trocNH)

-パリトキシシンアミド-エチレンジアミン-N'-(N-メチル)-グリシル-ビオチンを得る。troc基を水性THF中亜鉛で切断し最終生成物を得る。

D. C-55 パラトキシシン-ビオチン包含体

トリクロロエチル カルバメート-NH- パラトキシシン (troc-NH-パラトキシシン)。トリクロロエチル- クロロホルメート (アルドリッチ・ケミカル社から入手可能) をパラトキシシンのピリジン溶液に添加する。この溶液を23℃で6 時間攪拌し、溶媒を減圧下でエバポレートする。残渣を水に溶解し、ジクロロメタンで洗浄した。水性画分を凍結乾燥し、生成物をCM- セファデックス D-25 クロマトグラフィーで精製する。

Troc-NH-パラトキシシン- C_{55} -NH-(CH₂)₅-NH-ビオチン。メタノール (5N HCl/メタノールを添加してpH6 に調整したもの) 中、1.0 当量のtroc-NH-パリトキシシンおよび1 当量のビオチニルペンチルアミン (ピアス・ケミカル社、ロックフォード、イリノイから入手可能) を1 当量のNaCNBH₃に添加する。この反応混合物を23℃で24時間攪拌し、ビオチン化したパリトキシシン生成物を得る。

E. パリトキシシン- ストレプトアビジン包含体

Troc- アミン保護型パリトキシシンの炭素17のアミド結合をpH7.1 および37℃の温和な条件でアミド結合を選択的に切断する化合物であるペプチダーゼ (シグマ・ケミカル社から入手可能) で切断し、遊離型カルボキシ基を有するパリトキシシン分子を得る。この生成物を分取型HPLC- 逆相C-18クロマトグラフィーで精製する。遊離型のカルボキシ基をEDCIで活性化し、ストレプトアビジン (シグマ・ケミカル社から入手可能) に結合してN-troc- パリトキシシンアミド- ストレプトアビジンを得る。troc基は水性THF(>5:1 H₂O : THF)中亜鉛で切断して最終生成物を得られる。

実施例 XVII

ポリマー- リガンド包含体

ポリリシン (約10,000Da1 分子量、シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズリーから入手可能) およびデキストラン (リシン適合、シグマ・ケミカル社から入手可能) をSPDPで誘導体化し、サイズ排除クロマトグラフィー (ファルマシア社、ピスカタウェイ、ニュージャージー、のPD-10 カラム使用) で未反応のSPDPから精製する。生成したSPDP誘導型付加物をpH4.7 の0.2 M NaOAcバッファ中DTTで還元して遊離型の反応性チオールを生成する。例えば、Carlson et al., Bio

chem.J., 173 :723-737, 1978、に示されているグルコン酸スズから生成したTc-99mを添加した。ITLC測定によると15分間でポリリシン付加物によるTc-99mの取り込みは90%であった。サイズ排除(PD-10)クロマトグラフィーでは放射能の96%はデキストランと共溶出した。これらの結果はキレート化を示している。

実施例XVIII

トキシシン- ポリマー- リガンド包合体の合成

トリコテセン- ポリマー- リガンド包合体

プレターゲティング法におけるビオチン- デキストラン- トリコテセン包合体の使用を含む実験には以下のものが含まれる：

- 実施例XVIIで議論されている技術に従ってビオチン化された70,000ダルトンのデキストラン分子の使用可能なリシンのI-125 PIP NHS エステルを使用したトレース・ラベリングであって、放射能標識したデキストラン- ビオチン（デキストラン*- ビオチンで表される）の生成；
- NHS 活性化トリコテセンを用いる残存リシンへのトリコテセン薬剤包合体化
- 固定化アビジンへの薬剤- デキストラン*- ビオチン分子の結合の証明；
- マウスにおける血清クリアランスの評価。

共有結合した18個のビオチンおよび18個のリシンのεアミノ基を有する分子量70,000ダルトンのビオチン化デキストランはシグマ・ケミカル社（セントルイス、ミズーリー）から購入した。この物質を放射性標識するために、2 mlのガラスバイアル中、比活性2200mCi/mmole、4mCiのI-125 PIP NHS エステル（ニュージャージー、ボストン、マサチューセッツ）のアセトニトリル溶液を窒素気流中で乾燥させた。このヨウ素化化合物にpH9.0の1.0 M硼酸ナトリウム溶液0.650 mlに溶解した10mgのビオチン化リシン誘導型デキストラン凍結乾燥物を添加し、室温で10分間インキュベーションした。反応後放射性ヨウ素化デキストランを1%モルキュソル（ファルマテク、アラキュア、フロリダ）を含むリン酸緩衝液（すな

わち、6.2 Mリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、pH7.2）で平衡化したPD-10 カラム（ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン）を用いたサイズ排除クロマトグラ

フィーで精製した。ビオチン- デキストラン*はこのカラムから比活性0.2mCi/mg および濃度3.5mg/mlで2.4-4.8 mlフラクションに溶出した。

トリコテセンでビオチン- デキストラン*を誘導体化するために0.9 mlのビオチン- デキストラン*を1 % のモリキュソルを含むpH8.5、0.3 Mのほう酸ナトリウム緩衝液1.3 mlで希釈し、次いで攪拌しながら、1.2 mgの2'- デソキシ-2'- アルファ-(N-ヒドロキシスクシンイミジル-3- ジチオプロパン酸)- ロリジンA(すなわち、薬剤/使用可能リシンモル比：2:1)を含有する1.2ml のDMF を添加した。室温、1.5 時間のインキュベーション後、反応混合物の各1 ml部分標本(アリコート)を先に示したPBS で平衡化したPD-10 カラムで精製した。収率は85%を越えた。

ビオチン- デキストラン*- トリコテセン分子がアビジンまたはストレプトアビジンに結合しうることを確認するために、1 μ gのビオチン- デキストラン*および1 μ gのビオチン- デキストラン*- トリコテセンを、150 mMのNaClを含むpH 6.3 の0.2 M Pi バッファ0.2 ml中、アガロース・ビーズ(シグマ・ケミカル、セントルイス、ミズーリー)に不溶化したアビジン1 ユニットと室温で15分間インキュベートした。インキュベーション後、1.4 mlバッファによる希釈、アガロース懸濁液の遠心および1.4 mlバッファによるペレットの洗浄後、アガロース・ビーズに結合した放射能を測定した。ビオチン- デキストラン*およびビオチン- デキストラン*- トリコテセンのいずれも100 % の結合が観察された。

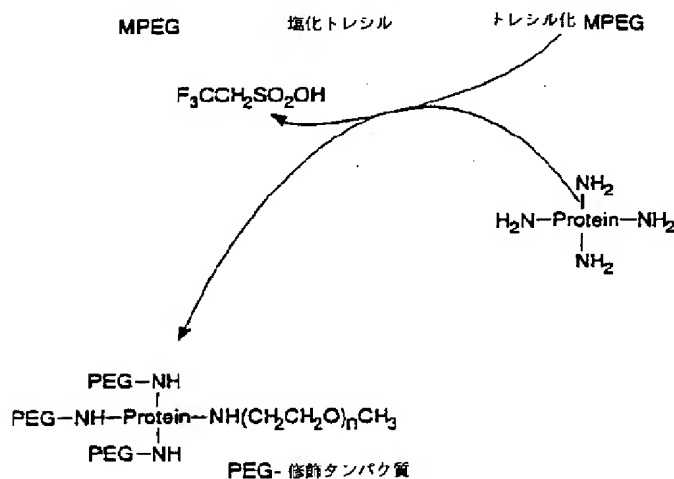
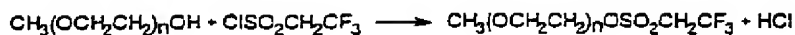
ビオチン- デキストラン*およびビオチン- デキストラン*- トリコテセンの血清クリアランス実験もBalb Cマウスを用いて行った。連続的血液サンプリングにより、両方の分子は2 μ Ciの注射で実質的に同じ血清クリアランスを示した。

実施例XIX

ストレプトアビジンのPEG 化

この実験の目的は種々のモル比でのストレプトアビジンのPEG化(「PEG 化」とは特定の部分、例えばタンパク質またはポリペプチドへのポリエチレン・グリコール残基の結合を示す)が多種のPEG 誘導体化およびストレプトアビジン・ビオチン結合能を起こすかどうかを測定することにある。

以下の実施例において、分子量5000ダルトンのトレシルPEG（シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズーリー）はトスレプトアビジンの誘導体化に使用する活性型PEGである。トレシルPEGはSAタンパク質のアミン基をアルキル化し、それによりPEG誘導体型SAを提供する。この反応スキームおよびシグマがトレシルPEGを生成した反応を以下に示す。



スキーム1：塩化トシルによるMPEGの活性化及びタンパク質のアミノ基への活性化ポリマーの結合に関する反応 (Delgado et al)

ポリエチレン・グリコールをストレプトアビジンに結合するためのプロトコル
実験プロトコルを以下に示す：

0.5 ml中各々2.96mgのストレプトアビジン(SA;49nmol)を用いる2つの反応を

行った。各溶液にpH10の1M炭酸塩50μlを添加し、さらにストレプトアビジンに対して2つのモル比：12および40倍(X)のトレシルPEGを加えた。12Xの反応ではSA溶液にdH₂O中2.95mgのトレシルPEGを添加した。40Xの反応では、dH₂O中9.8 mg (1.96μmol)のトレシルPEGを添加した。いずれの反応も全ての反応成分を混合してから10分で完了した。続いて未反応のトレシルPEGおよびその加水分解物をPBSで平衡化したS-200(ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン)を用いて除去した。結果を以下に示す。12X反応の濃縮後の回収物は3.51mg/mlのもの0

.5ml、即ち1.76mgであった。40X 反応の濃縮後の回収物は3.71mg/mlのもの0.5 ml、即ち1.85mgであった。

これらの反応の完了後、PEG 化の割合をプロトン核磁気共鳴 (NMR) で測定した。4 個の反復するエチレンプロトン/PEG サブユニットは約3.6 ppm にシングレットを与える。このシグナルを積分しトルエンスルホン酸 (TSA) の内部標準と比較した。3 個のメチルプロトン/TSA 分子は約2.3 ppm にシングレットを与えた。PEG 化の相対的評価も GF-250 Zorbax (ゾルバックス) (デュポン、ウィルミントン、デラウェア) カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーを用いて行った。これらの実験結果を以下に示す。

NMR 12X:

53mg (0.15ml) の包合体をロータリーエバポレーターで乾燥し、0.5 mlのD₂O に溶解した。この最終タンパク質濃度 (A₂₈₀) は1.0 mg/mlであり、この試料には0.5 mgまたは8.3 mmolのSAが含まれる。内部標準として8.76mg(45.6 μmol)のTSA をD₂O に溶かし、SA溶液に添加した。SAおよびTSA を含む最終試料容積は0.8 mlであった。TSA 量はSA誘導体化が100 % 効率としてPEG シグナルが占める面積を3 倍したシグナルを提供すると計算された。

NMR 40X:

0.52mg (0.14ml) の包合体をロータリーエバポレーターで乾燥し、0.5 mlのD₂O に溶解した。この最終タンパク質濃度 (A₂₈₀) は1.03mg/mlであり、この試料には0.51mgまたは8.5 mmolの包合体が含まれる。内部標準として4.92mg (25.84 μmol) のTSA をD₂O に溶かし、包合体溶液に添加した。最終試料容積は0.8 mlであった。TSA 量はSA誘導体化が100 % 効率としてPEG シグナルが占める面積を0.5 倍したシグナルを提供すると計算された。

ビオチン結合能

PEG誘導体化ストレプトアビジン分子のビオチン結合能をビオチンによるストレプトアビジンからの2-(4'-ヒドロキシ-アゾベンゼン)安息香酸 (HABA) の置換を用いて測定した。HABAがストレプトアビジンに結合すると結合したHABA量に応じて500 nmにスペクトル変化を示す。HABAはビオチンによりストレプトアビジ

ンから定量的に置換される。このことでビオチンによるHABA-SA 複合体のタイトレーションは500 nmの吸光度を直接モニターでき、ビオチン結合部位のモル濃度が提供される。修飾されたストレプトアビジン濃度に対する結合部位濃度の比はその変化が如何にビオチン結合能に影響するかの指標を提供している。(未修飾のストレプトアビジンは4 個のビオチン分子を結合する) 実験プロトコルを以下に示す:

PEG 修飾および未修飾SAのHABA検定

目的のタンパク質をPBS 0.25mg/mlの濃度に希釈し、500 nmにおける分光光度計のブランクとして使用した。10mM NaOH中10mMのHABA溶液25 μ lをこの溶液に添加し、 A_{500} を測定した。500 μ Mのビオチン溶液の5 μ l部分標本を連続的に添加し、各々の添加後に A_{500} を測定した。ビオチンの添加はもはや A_{500} が変化しなくなるまで続けた。反曲点は試料溶液中に存在するビオチン結合部位の濃度に等しい。ビオチン結合部位濃度を包合体の濃度で割った値は、結合部位/SA比に等しい。

結果

NMR およびSEC の結果

12X および40X PEG 誘導体化SA試料のプロトンNMR プロットを各々解析した。その結果は、12X 投与比で誘導体化したストレプトアビジンはSA分子当たり平均7.4 個のPEG で誘導体化されていることを示した。40X の投与比で誘導体化したSAは、SA分子当たり平均18.8個のPEG で誘導体化されていた。誘導体化レベルの差はGF-250クロマトグラフィーにも反映されており、その結果を以下の表に示した。

表5

試料	保持時間
SA 対照	9.68
12X 提供	7.57
40X 提供	7.22

保持時間 (分)

これらの実験の結果はPEG誘導体化試料の溶出は、非-または低誘導体化ストレプトアビジン試料(12X)よりも高誘導体化ストレプトアビジン(40X)の方が早く溶出すると言うように、そのPEG負荷レベルに応じて起こることを示している。また、各誘導体化ストレプトアビジン試料のピーク幅は対照のストレプトアビジンよりも広い。この事は12X試料の場合に最も明白である。このブロードニングはクロマトグラフィーの挙動と不均一性の二つに寄因すると考えられており、かつ定量的試験は分子種の平均的値を示していることの指標となる。

ビオチン結合検定の結果

HABA検定を使用してSA対照およびPEG:SA包合体のビオチン結合能を測定した。以下の表に検定結果を示す。

表6

500 μ M ビオチン 溶液累積容積 μ l	0.32mg SA 対照、 A ₅₀₀	0.25mg SA + 7.4 PEG'S A ₅₀₀	0.25mg SA+18.8 PEG'S, A ₅₀₀
0	0.718	0.234	0.186
5	0.660	0.198	0.158
10	0.602	0.166	0.152
15	0.546	0.158	0.151
20	0.490	0.158	
25	0.442		
30	0.382		
35	0.325		
40	0.269		
45	0.217		
50	0.161		
55	0.157		
60	0.164		

SA対照:

- $(0.32\text{mg SA}/60\text{K g/mol}) \times 1000 = 5.3 \text{ nmol}$ ストレプトアビジン
- $500\mu\text{M}$ のビオチン溶液 $50\mu\text{l} = 25\text{nmol}$ ビオチン
- ビオチン/SA: 25nmol ビオチン/ 5.3nmol SA = 4.7 ビオチン結合/ストレプトアビジン
- 理論的には4.0 ビオチン/ ストレプトアビジンなのでこの値は理論よりも約15% 大きい。

12X 提供:

- $(0.25\text{mg (PEG)}_{7.4}/60\text{K g/mol}) \times 1000 = 4.2\text{nmol}$ PEG: ストレプトアビジン。ストレプトアビジンへのPEG の付加は、その物質量は増加するが、BCA およびA-280によりPEG が蛋白質の質量測定を妨害しないことが確認された。したがって、上述の計算に使用した60KdはこれらのPEG 誘導体実験において許容しうるものであることが分かった。

-500 μ M ビオチン溶液 15 μ l = 7.5nmol ビオチン- ビオチン/PEG:SA = 7.5 nmol

ビオチン/4.2nmol PEG:SA = 1.79 結合ビオチン/PEG:SA

40X 投与:

-(0.25mg(PEG)_{18.8}SA/60K g/mol)x1000 = 4.2 nmol PEG:SA

-500 μ M のビオチン溶液 10 μ l = 5.0 nmol ビオチン

- ビオチン/PEG:SA = 5.0 nmol ビオチン/5.0nmol PEG:SA = 1.19結合ビオチン

/PEG:SA

ビオチン結合データを表7 に示した。

表7

試料	ビオチン/SA
SA 対照	4.70
(PEG) _{7.4} :SA	1.79
(PEG) _{18.8} :SA	1.19

これらの結果は、PEG 誘導体化の増加にしたがってビオチン結合能の損失があることを示している。この問題を克服するために、本発明者からビオチン結合部位はPEG 化過程の間保護されなければならないという仮説が立てられた。しかし、まずPEG 化がビオチン結合能の損失を起こす蛋白質の構造の変化を誘導するかどうかを調べる必要がある。この事が起こるかどうかを測定するために以下の実験を行った。

ストレプトアビジンに関するPEG 誘導体化の構造的影響の評価

手順

- SAを¹²⁵I (14 μ Ci) 標識N-(p- ヨードベンゾイル)ビオシチン(PIB-ビオシチン)と混合し、約15分間インキュベートした。ビオチン結合部位に対して5 倍モル過剰のビオチンをストレプトアビジン-PIB- ビオシチン複合体に添加した。もし、PIB-ビオシチンがPEG 化によって置換し、ストレプトアビジンの結合部位が

反応性のままでいるなら、ビオチン分子は結合部位を占拠しPIB-ビオシチンを溶液中に遊離させるであろう。

- 先の実験で述べたものと同様の方法を用い、pH10.0で40X モル過剰のトレシル PEG とストレプトアビジンを反応させた。
- また、同時に調製した二つの対照反応を行った。これには、非PEG 化ストレプトアビジン試料および ^{125}I -PIB-ビオシチン試料が含まれる。
- GF-250 SEC によるPEG 化反応の完了の確認後、3 個全ての試料を30Kdカットオフの超遠心素子（アミコン社、バーバリー、MA）で遠心し、全体、濾過液および濾過物の放射能をスクイブCRC-6A放射性同位元素キャリブレーター（スクイブ、プリンストン、NJ）で測定した。以下の表にセントリコンの結果を示す。

表8
測定された ^{125}I のマイクロキュリー

測定試料	総計	濾過液	濾過物
^{125}I PIB-ビオシチン	15.9	14.4 (91%)	1.4 (9%)
SA+ ^{125}I PIB- ビオシチン	13.4	1.8 (14%)	11.2 (86%)
PEG:SA+ ^{125}I PIB- ビオシチン	13.1	1.4 (11%)	11.4 (89%)

PEG 化SA: ^{125}I PIB- ビオシチン複合体のSEC トレースは、7.32分の保持時間を示し、この値は初期のPEG 化実験で得られた値と同じである(表1)。 ^{125}I PIB-ビオシチン対照は、90% 以上の放射能がセントリコン膜を通過したことを示しており、このことは巨大分子SA分子と相互作用しない小分子(<1000ダルトンMW)の場合と一致している。SA + ^{125}I PIB ビオシチンの86% は超遠心後、濾過物中に残留していた。このことは、もし、 ^{125}I IB- ビオシチンが60MW蛋白質に結合しているなら予想される結果である。PEG:SA + ^{125}I PIB-ビオシチン試料は、SA + ^{125}I PIB-ビオシチン対照と同様に、放射能の89% が濾過物中に残留するような安定なビオチン結合特性を示した。

このように、これらの結果はPEG 化に寄与する蛋白質の構造変化が実質的な

いという事実に基づき、優れたビオチン結合能を保持するポリエチレングリコール誘導体化ストレプトアビジンが得られたという証拠を提供している。さらに、

これらの結果はストレプトアビジンのビオチン結合能の低下を引き起こすストレプトアビジン分子の有意の構造変化は無いことを示している。おそらく立体障害のためにPEG誘導体化ストレプトアビジンがビオチンにうまく結合しないという仮説が立てられる。従って、PEG化以前のストレプトアビジンのビオチン結合部位の保護は、そのような立体的制約を未然に防ぐことになる。このような保護はビオチン結合部位に可逆的に結合する部分の結合で行いうる。それゆえPEG化操作の間のブロッキング剤としてイミノビオチンの可逆的ストレプトアビジン結合特性を利用する実験を行った。この実験はPEG化の前に、イミノビオチンによりビオチン結合部位を占拠させ、PEG化の後にイミノビオチンを開放することでストレプトアビジンのビオチン結合能を保持されることを示すように行った。

PEG化前のストレプトアビジンのイミノビオチン保護

イミノビオチン(IB)はストレプトアビジンへの強力な可逆的な結合能によりビオチン結合部位のブロッキング剤として選択された。pKa11-12に近いpHにおいて、IBのグアニジノ基は部分的乃至全体的に脱プロトン化しておりSAに対する結合アフィニティーが増加している。さらに、PEG化後、結合および未結合IBは低pH(4.0)のゲル濾過で反応混合物から除去される。しかし、他の低アフィニティービオチンアナログもイミノビオチンと置き換えることができる。これらの観測は以下の実験の基礎となっている。

実験プロトコル

- 0.5 mlバッファ中2.0 mgのSA(48nmol)にpH10.0の1.0 M炭酸塩50 μ lを添加した。
- 48nmol SA X4 結合部位/SA X5(過剰) = イミノビオチン(IB)(243.3 MW)0.96 μ mol を反応混合物に添加した。
- $0.96 \mu\text{mol} \times 0.2433 = 0.23 \text{ mg IB}$
- $(1000 \mu\text{l/ml} \times 0.23\text{mg}) / 1.4 \text{ mg/ml IB溶液} = 164 \mu\text{l IB dH}_2\text{O水溶液}$
- 反応、15分
- トレシルPEG: $48 \text{ nmol SA} \times 40 \text{ (過剰)} \text{トレシルPEG} = 1.93 \mu\text{mol トレシルPEG}$
- $1.93 \mu\text{mol トレシルPEG} \times 5 \text{ K g/mol} = 9.7 \text{ mg トレシルPEG}$

- 反応はZorbax SECでモニターし、10分で完了した。
- 反応完了後、pHは1 M酢酸で3.0 まで落とし、0.1 % 酢酸で平衡化したS-200SEC カラム（ファルマシア、ウプサラ、スウェーデン）で精製し、PEG 副産物および置換型IBを除去した。
- さらに最終的なPEG:SA包合体の特性決定のために限外濾過およびPBS へのバッファ交換を行った。
- SEC、HABAおよびNMR 検定を上述のように行った。これらの実験の結果を以下に示す。

SA対照および上記のように調製したSA: PEG 包合体のZorbax SECの結果を重ね合わせた。PEG 化SAの保持時間は7.37分であり、この値は以前に測定した12X および40X の保持時間の中間にある（表1 参照）。プロトンNMR スペクトルは10.92 PEG /SA分子であることを示し、この値は以前の実験の40X で観測された誘導体レベルよりも低い、12X 提供で観測された値よりも有意に高い。このことはSEC データと一致する。以下に示す表はPEG: SA包合体の調製に関するHABA検定の結果をまとめたものである。

表9

500 μ M ビオチンの累積容積 μ l	A ₅₀₀
0	0.394
5	0.355
10	0.317
15	0.279
20	0.241
25	0.203
30	0.168
35	0.163

HABA検定における0.25mgのSA: PEG は4.2nmol に相当する。結合したHABAを置換するには500 μ M溶液30 μ l (15nmol)が必要であった。従って、ビオチン/SA比

はSA: PEG 包合体分子当たりの結合ビオチン15/4.2 すなわち3.6 である。これらの結果は非ブロックSA: PEG 包合体で測定された結果よりも有意に優れている。従って、これらの結果はPEG 化前にビオチン結合部位をブロックすることはビオチン結合能の損失を緩和することを示している。他のビオチン結合部位保護物質、例えば低アフィニティービオチンアナログ、ビオチン結合部位に結合するペプチド類似体、ビオチン結合部位に対する抗体およびそのフラグメント、およびその組み換え体を用いても同様の結果が得られることが予想される。多くの低アフィニティービオチン・アナログが知られ、かつ入手可能であり、本出願の他所でも同定されている。これらの結果を以下に示す。

当初、本発明者らはタンパク質のトレシルPEG 誘導体化は修飾されたアミノ基の電荷が維持されるため、このタイプのストレプトアビジンのPEG 化はビオチン結合能への影響は小さいという仮説を立てた。予想に反して、文献に報告されている操作でストレプトアビジンをトレシルPEG で直接包合体化すると小分子のビオチンを結合する能力の実質的損失を起こすことが分かった。また、標識したビオチンを予め結合しておいたストレプトアビジンをトレシルPEG で誘導体化してもビオチンは放出されないことが分かった。このことはPEG 化がタンパク質を破壊せず、かつ、交換可能なビオチン・アナログでストレプトアビジンのビオチン結合部位を予めブロックしておくことは修飾（PEG 化）後のストレプトアビジンのビオチン結合能を効果的に保護するという点に関する強力な証拠を提供した。

イミノビオチンは溶液のpHに依存してストレプトアビジンに対するアフィニティーが変化するビオチン・アナログである。高pHではイミノビオチンはストレプトアビジン分子に強く結合し、優れたブロッキング特性を提供する。このストレプトアビジン- イミノビオチン複合体のPEG 化、反応液のpHの低下によるイミノビオチンの除去、および低pHで平衡化したゲル濾過カラムによる試料の精製でビオチン結合能を保持したSA: PEG 包合体が生成する。

以下に示す実験は本方法の有効性および当所の本発明者の仮説の正当性を示している。in vivo および in vitro 実験は本明細書で示されている方法を用いてPEGで修飾したストレプトアビジンの免疫原性はバックグラウンド・レベルまで減少

し

ていることを示した。また、この様にPEGで誘導体化したストレプトアビジンは、抗原伸介ターゲッティングを目的とした抗体に容易に結合する。従って、これらの結果はポリエチレングリコール誘導体化リガンドおよびアンチリガンド、例えばストレプトアビジンとアビジンはプレターゲッティング法で使用することを目的とした包合体の調製に有用である。このようなPEG誘導体化リガンドおよびアンチリガンドは免疫原性が潜在的な重要性を有している治療に用いるプレターゼッティング法に対しては特に適している。

さらに、クリアリング剤の投与は、治療薬が免疫系と接触する時間を短くするであろうことから、上述の投与された治療薬包合体に対する潜在的抗原反応を緩和することが予想される。また、これらの結果はプレターゲッティングプロトコルで用いられるターゲッティング部分または活性薬剤と同様に他のリガンドまたはアンチリガンドにも外挿しうることを予想される。

実施例XX

超抗原プレターゲッティング

患者は結腸ガンを示している。結腸ガン細胞抗原に対するモノクローナル抗体(MAb)、例えば、NR-LU-10をストレプトアビジンと結合しMAb-ストレプトアビジン包合体を形成した。ターゲットの使用可能な抗原部位を実質的に飽和するのに十分な量のMAb-ストレプトアビジン包合体を患者に投与する(この量は少なくともターゲットの治療的に有効な活性薬剤を捕獲するのに十分なものであり、かつ、モノクローナル抗体-キレート-放射性核種包合体の投与のように、従来のターゲッティド・キレート標識分子プロトコルにおいて投与可能な包合体の最高許容投与量を越える量である)。このように投与されたMAb-ストレプトアビジンは24-44時間、望ましくは48-72時間、ターゲット・ガン細胞に局在化させる。

上述のように調製された包合体であるビオチン-活性薬剤、例えばトキシシンまたはサイトカインまたは放射性核種、は医薬的に許容された希釈剤に分散され、治療的有效量(例えば、ターゲット細胞部位で細胞毒性効果を誘導するのに十分な量)が投与される。ビオチン化超抗原は腫瘍部分にターゲットされたMAb-スト

レプトアビジンに局在化するか、または代謝されるか、または腎臓経路を介して

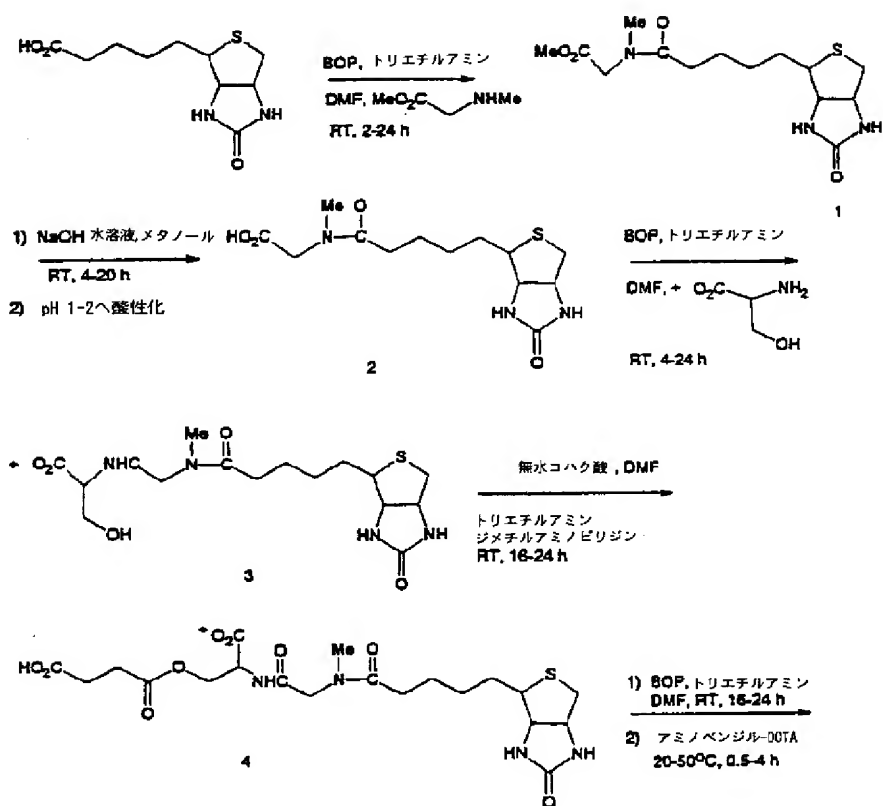
患者から排出される。

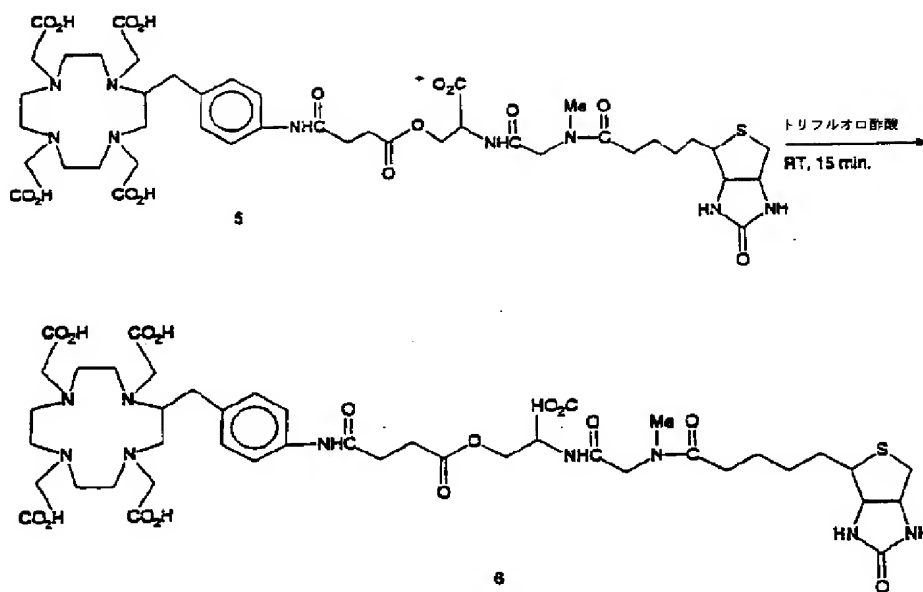
実施例XXI

提案されるビオチンアミド-N-メチルグリシル-セリル-O-スクシニアミド-ベンジル-DOTAの合成

ビオチンアミド-N-メチルグリシル-セリル-O-スクシニアミド-ベンジル-DOTAの合成は、以下に示す合成スキームで行う。

ビオチンアミド-N-メチルグリシル-セリル-O-スクシニアミド-ベンジル-DOTA (6) への合成経路





ビオチンアミド-N-メチルグリシン メチル エステル (4) の合成

無水ジメチルホルムアミド中のビオチンに1.1 当量のN-メチルグリシン メチル エステルおよび3 当量のトリエチルアミンを加え、さらに1.05当量のBOP(ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ-トリス(ジメチルアミン)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート)を添加する。この混合物を0-25℃で2-24時間攪拌した後、濃縮する。この残査を酢酸エチルで希釈し、溶液を1N HCl で洗浄後、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液で洗浄する。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、濾過後、減圧下のロータリーエバポレーターで濃縮する。この残査を5-15% メタノール/酢酸エチルで溶出するシリカゲルのクロマトグラフィーで分画する。産物を含むクロマトグラフィーのフラクションを合わせ、濃縮して最終産物(4)を得る。

ビオチンアミド-N-メチルグリシン (5) の合成

メタノール中のビオチンアミド-N-メチル-グリシン メチル エステル溶液に1.5-2.0 当量の1N NaOH溶液を添加する。この混合物を15-45℃で4-24時間攪拌後、減圧下のロータリーエバポレーターで濃縮する。残査を脱イオン水で希釈し、溶液のpHを6N HCl でpH1-2 に調整する。再び、この溶液を減圧下のロータリーエバポレーターで濃縮する。この残査を逆相C-18シリカゲルのクロマトグラ

フィーにかけ、メタノール/水で溶出する。生成物を含むフラクションを合わせ、濃縮して最終生成物(5)を得る。

ビオチンアミド-N-メチルグリシル-セリン t-ブチルエステル(6)の合成

無水ジメチルホルムアミド中のビオチンアミド-N-メチルグリシン(5)の溶液に1.1当量のセリン t-ブチルエステルおよび3当量のトリエチルアミン、さらに1.05当量のBOPを添加する。この混合物を0-25℃で2-24時間攪拌後、減圧下のロータリーエバポレーターで濃縮する。この残査を酢酸エチルで希釈し、その溶液を1N HCl、つづいて炭酸水素ナトリウム飽和水溶液で洗浄する。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、汙過して濃縮する。その残査をシリカゲルのカラムにかけ、メタノール/酢酸エチルで溶出する。生産物を含むフラクションを合わせ、濃縮して最終産物(5)を得る。

ビオチンアミド-N-メチルグリシル-セリル t-ブチルエステル-0-スクシネート(7)の合成

無水ジメチルホルムアミド中のビオチンアミド-N-メチルグリシル-セリン t-ブチルエステル(6)の溶液に3当量のトリエチルアミン、0.01-0.1当量の4-ジメチルアミノピリミジンおよび1.1当量の無水コハク酸を添加する。この混合物を0-25℃で20-24時間攪拌後、減圧下のロータリーエバポレーターで濃縮する。残査を酢酸エチルおよび1N HClで希釈する。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥後、汉過して濃縮する。残査を逆相のC-18シリカゲル・カラムにかけ、メタノール/水で溶出する。生成物を含むフラクションを濃縮して最終生産物(7)を得る。

ビオチンアミド-N-メチルグリシル-セリル t-ブチルエステル-0-スクシンアミド-ベンジル-DOTA(8)の合成

無水ジメチルホルムアミド中のビオチンアミド-N-メチルグリシル-セリル t-ブチルエステル-0-スクシネート(7)の溶液に10当量のトリエチルアミンおよび0.9-1.0当量のBOPを添加する。この混合物を15-25℃で16-24時間攪拌後、無水ジメチルホルムアミド中のアミノベンジル-DOTAを添加する。この混合物を20-50℃で0.5-4時間攪拌後、濃縮する。残査をクロマトグラフィーで生成して

最終産物 (8) を得る。

ビオチンアミド-N- メチルグリシル- セリル-O- スクシンアミド- ベンジル-DOTA
A (9) の合成

トリフルオロ酢酸にビオチンアミド-N- メチルグリシル- セリル t- ブチルエステル-O- スクシンアミド- ベンジル- DOTA (8) を添加する。この混合物を15-25℃で15分間攪拌後、減圧下のロータリーエバポレーターで濃縮する。残査をイオン交換クロマトグラフィーで精製して最終生成物 (9) を得る。

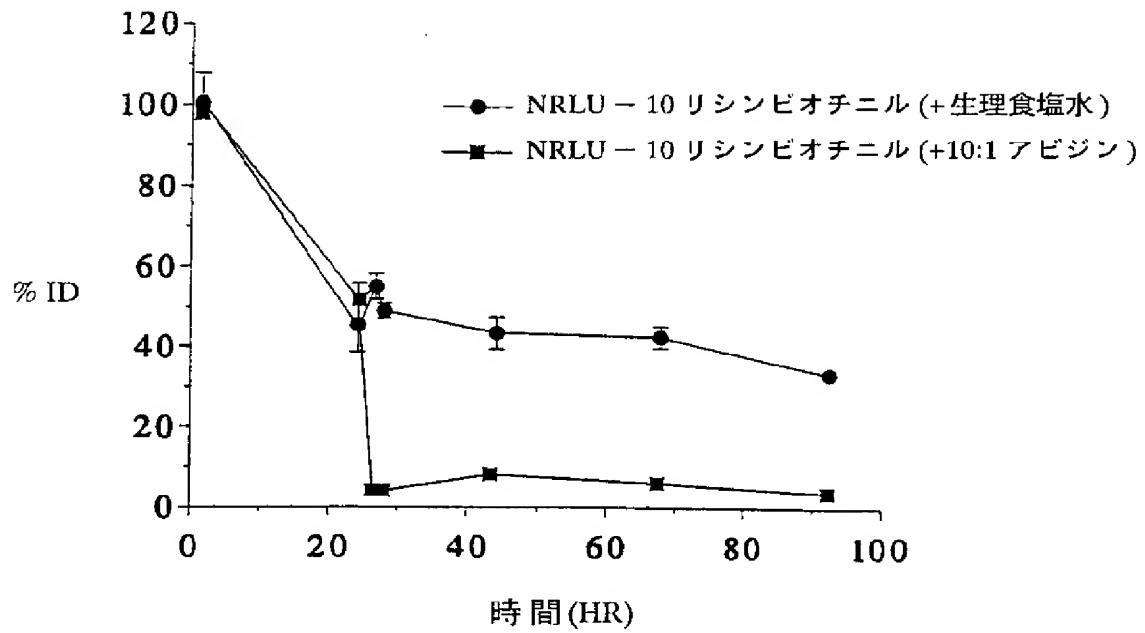
この反応スキームは先に示した。

また、本発明は上述の1つ以上の成分を含むキットにも関する。例えば、放射性ハロゲン化ビオチンがプレターゲッティング法に使用する目的で無菌的容器で提供されうる。無菌的容器で提供されるキレート- ビオチン包合体は消費者によるラジオメタレーションに適している。このようなキットはプレターゲッティング・プロトコルで使用するのに特に適している。それとは別に放射性ハロゲン化ビオチンおよびキレート- ビオチン包合体は研究試薬として非無菌状態でビン詰めすることもできる。

以上、本発明の特定の態様について説明の目的で記載したが、本発明の概念及び範囲内で種々の変形が可能であることが理解されよう。従って、本発明は請求の範囲のみにより限定されるものである。

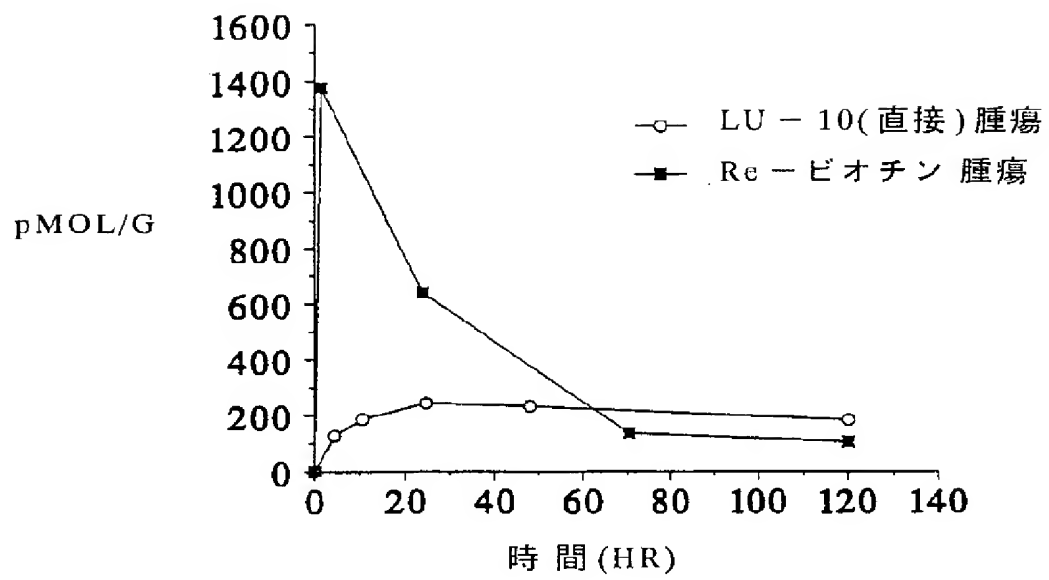
【図1】

図 1



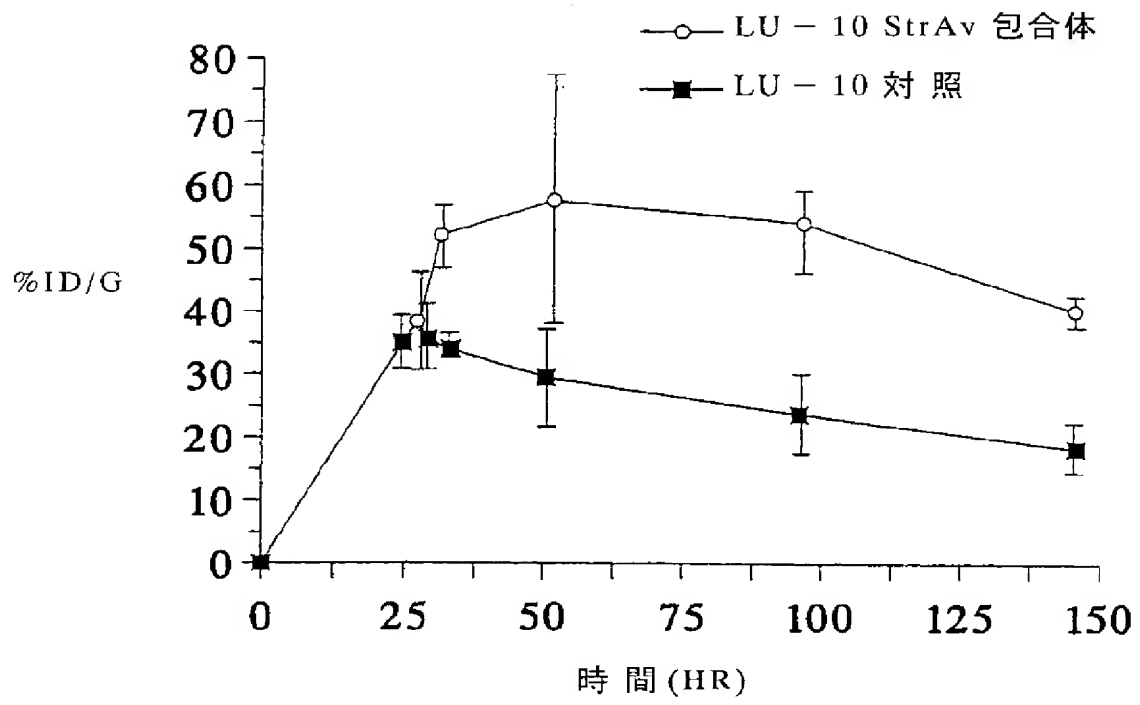
【図2】

図 2



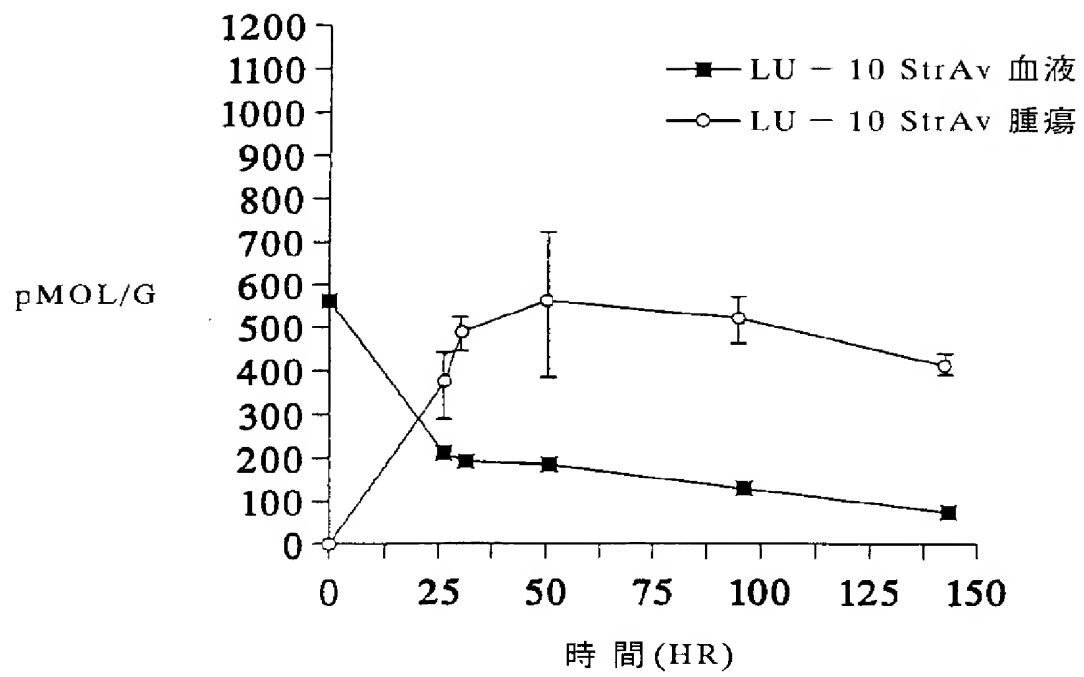
【図3】

図 3



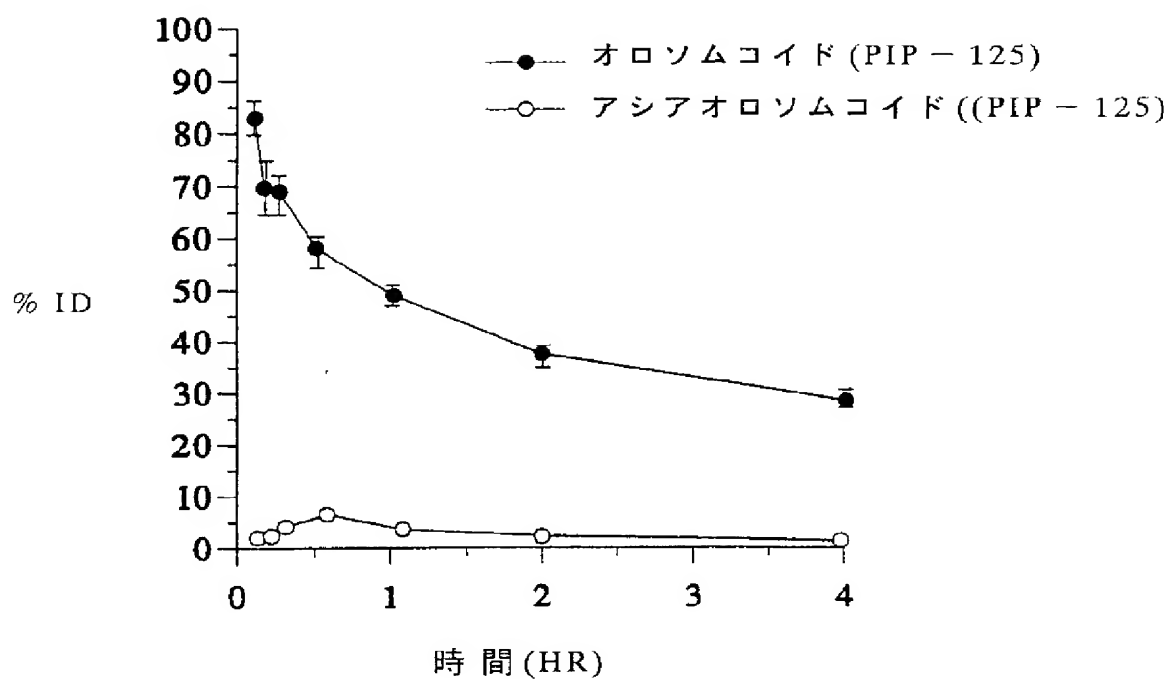
【 図 4 】

図 4



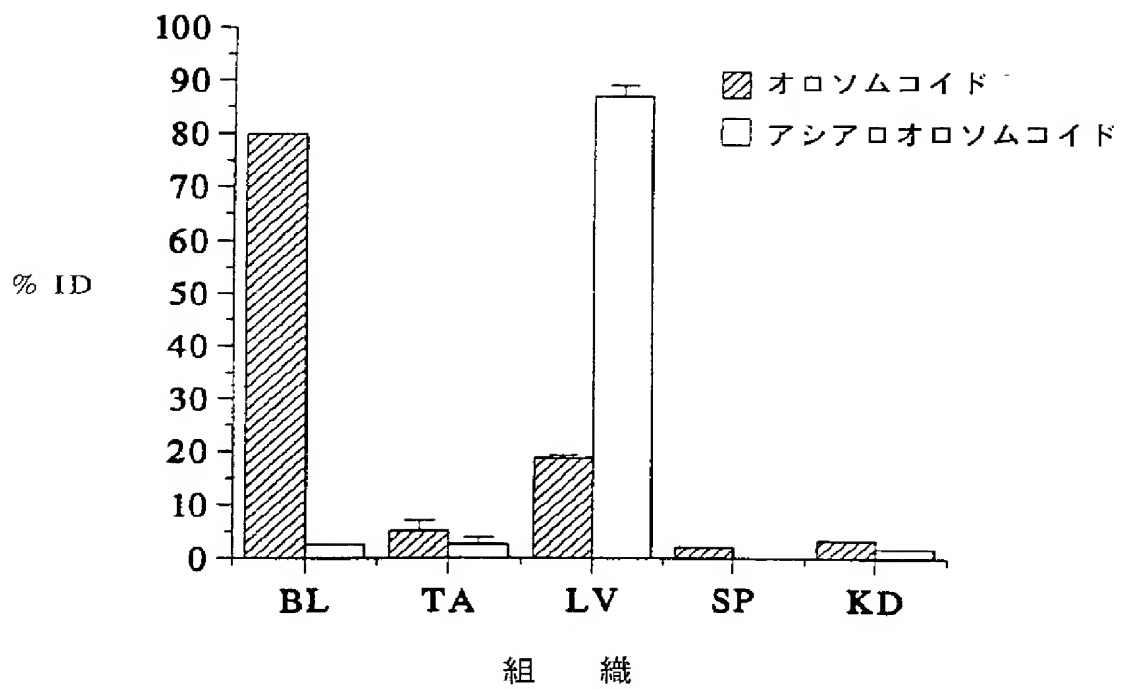
【図5】

図 5



【図6】

図 6



【図7】

図 7

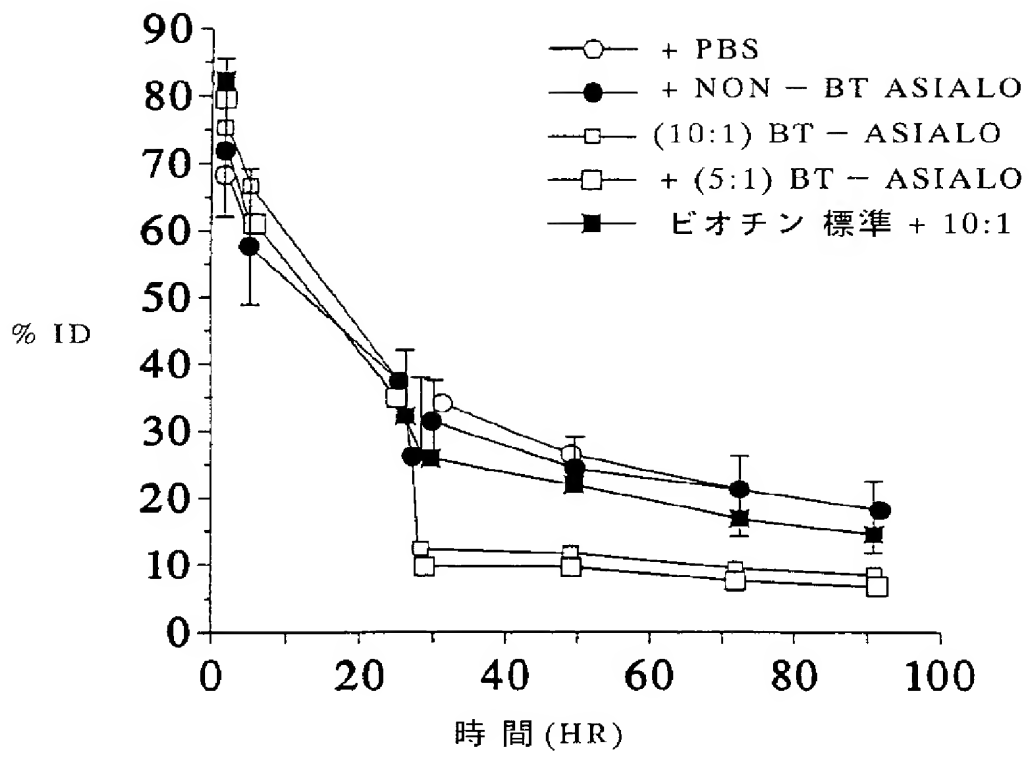
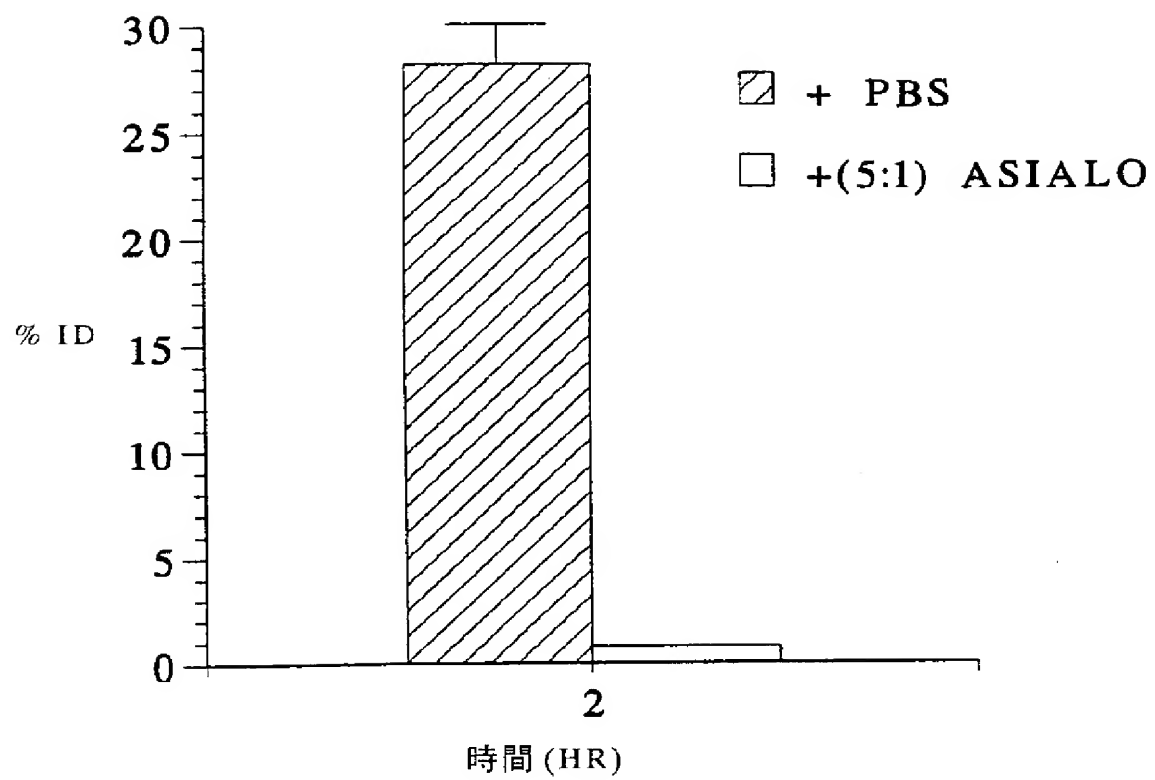


図 8

	%ID									
	+PBS	SD	+NON-BT	SD	+10:1	SD	+5:1	SD	BT-SAT'D	SD
血液	31.05	5.08	29.94	1.35	8.54	0.91	7.03	0.18	24.58	0.68
尾	2.43	0.70	1.80	0.09	1.46	0.09	1.76	0.04	1.96	0.40
肺	1.47	0.26	1.09	0.22	0.54	0.10	0.48	0.07	0.76	0.01
肝臓	5.42	0.69	4.66	0.36	9.60	1.20	9.11	0.41	6.76	0.06
脾臓	0.25	0.05	0.34	0.03	0.17	0.03	0.18	0.00	0.38	0.02
胃	0.28	0.02	0.33	0.03	0.53	0.34	0.49	0.00	0.29	0.04
腎臓	1.72	0.24	1.38	0.08	2.76	0.00	3.28	0.32	1.58	0.08
腸	3.40	0.73	3.44	0.10	4.22	0.02	6.62	0.14	2.83	0.13
グループ 1	46.02		42.98		27.83		28.95		39.13	
			グループ 2		グループ 3		グループ 4		グループ 5	

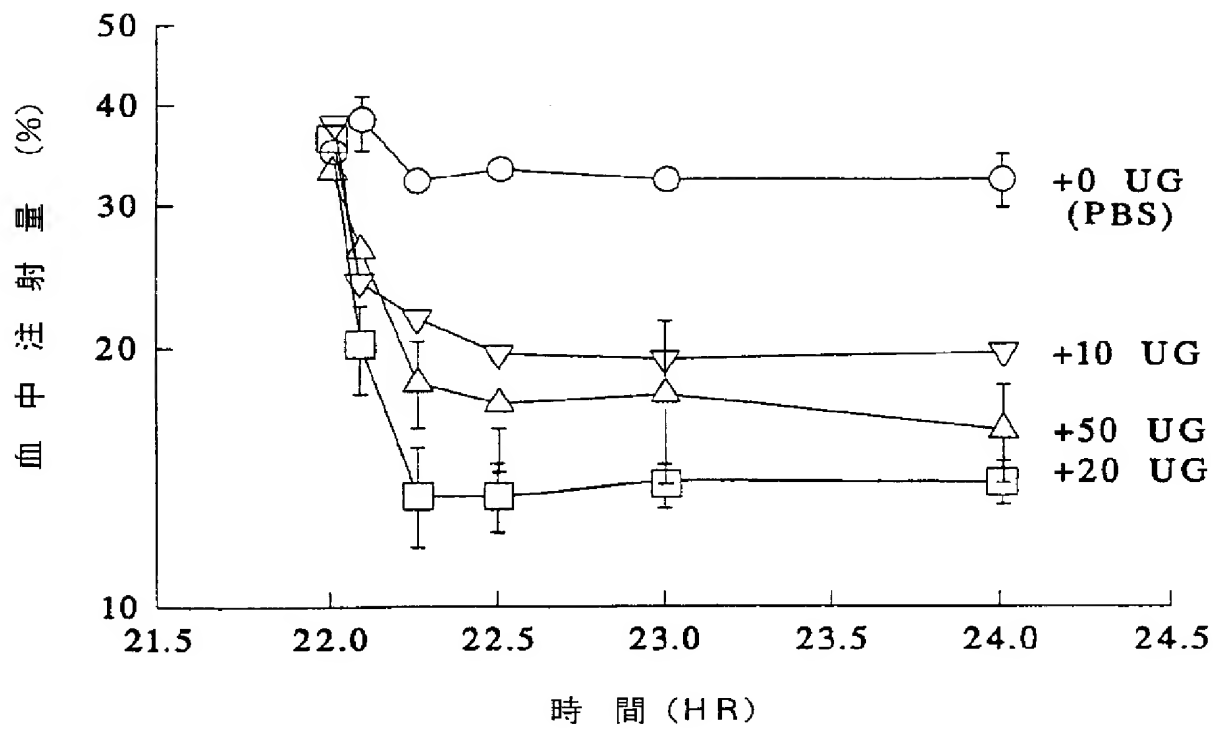
【図9】

図 9



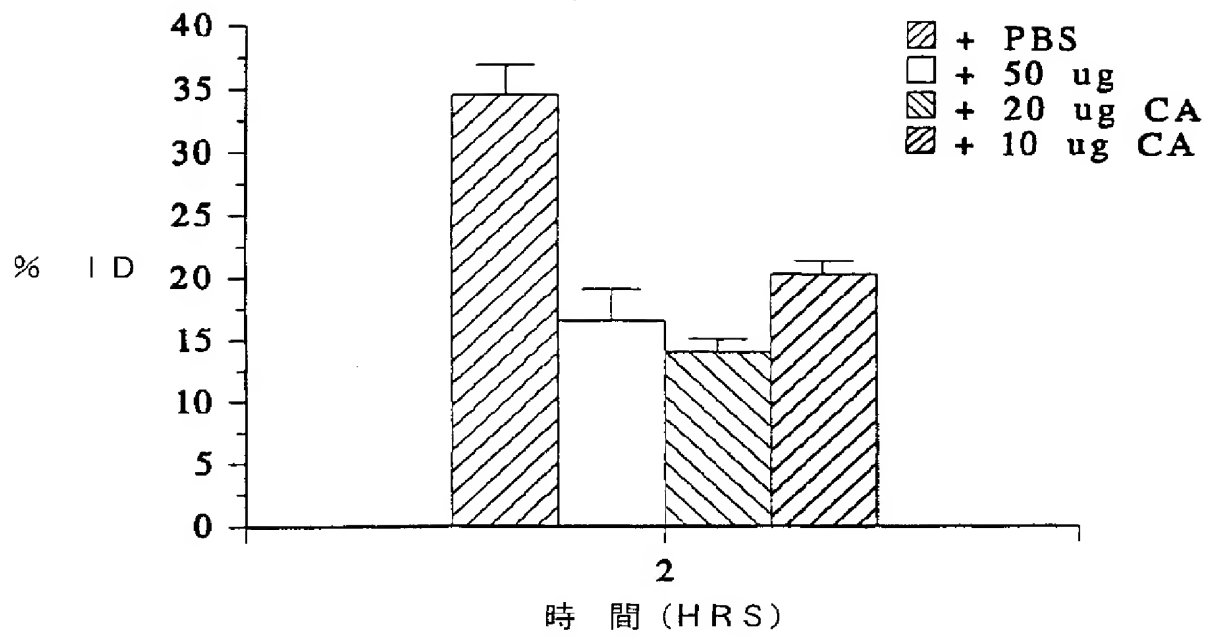
【図10】

図 10



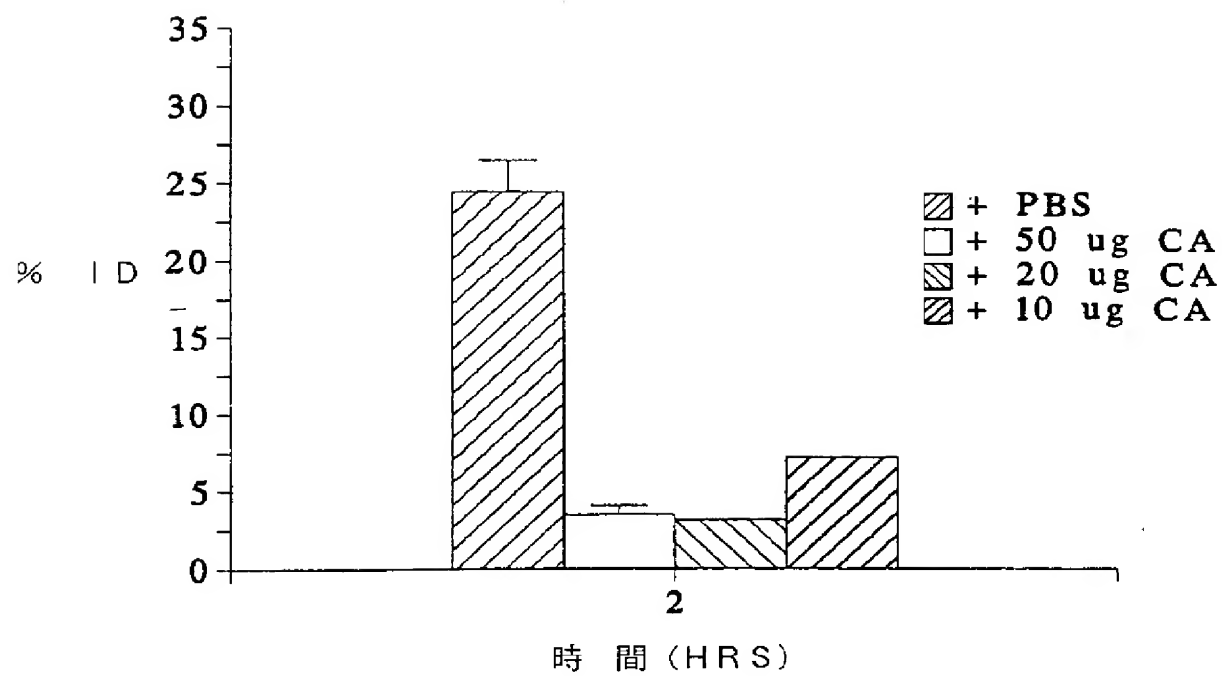
【図11】

図 11 A



【図11】

図 11 B



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/14174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(6) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/178.1, 179.1, 181.1, 182.1 183.1, 85.1, 85.4, 85.5, 85.6, 85.7; 330/391.1, 402, 395, 399, 351, 363 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS/DIALOG, EMBASE, WPI, LIFESCI, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, A, 0,251,494 (GOODWIN ET AL.) 07 JANUARY 1988, ENTIRE DOCUMENT.	1-53
Y	EP, A, 0,496,074 (PAGANELLI ET AL.) 29 JULY 1992, ENTIRE DOCUMENT.	1-53
Y	WO 89/10140 (BAGSHAW ET AL.) 02 NOVEMBER 1989, ENTIRE DOCUMENT.	1-53
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, VOL. 90, ISSUED 01 OCTOBER 1993, F.J. BURROWS ET AL., "ERADICATION OF LARGE SOLID TUMORS IN MICE WITH AN IMMUNOTOXIN DIRECTED AGAINST TUMOR VASCULATURE", PAGES 8996-9000, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-53
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"F"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 13 FEBRUARY 1995		Date of mailing of the international search report 17 MAR 1995
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Christopher E. Schenk</i> CHRISTOPHER EISENSCHENK Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/14174

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. NATL. CANC. INST., VOLUME 85, NO. 6, ISSUED 13 MARCH 1993, H.I. PASS, "PHOTODYNAMIC THERAPY IN ONCOLOGY: MECHANISMS AND CLINICAL USE", PAGES 443-456, ENTIRE DOCUMENT.	1-53
Y	J. BIOL. CHEM., VOL. 252, NO. 11, ISSUED 10 JUNE 1977, A. ABUCHOWSKI ET AL., "EFFECT OF COVALENT ATTACHMENT OF POLYETHYLENE GLYCOL ON IMMUNOGENICITY AND CIRCULATING LIFE OF BOVINE LIVER CATALASE", PAGES 3582-3586, SEE ENTIRE DOCUMENT.	1-53
Y	IMMUNOLOGY LETTERS, VOL. 15, ISSUED 1987, I. WILKINSON ET AL., "TOLEROGENIC POLYETHYLENE GLYCOL DERIVATIVES OF XENOGENEIC MONOCLONAL IMMUNOGLOBULINS", PAGES 17-22, ENTIRE DOCUMENT.	1-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US94/14174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (6):

C07K 14/52, 14/525, 14/53, 14/535, 14/54, 14/555, 16/00, 16/30; A61K 38/17, 38/38, 51/10, 121:00; C07D 495/04

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

424/178.1, 179.1, 181.1, 182.1 183.1, 85.1, 85.4, 85.5, 85.6, 85.7; 530/391.1, 402, 395, 399, 351, 363

 フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	
A 6 1 K 39/395		7433-4C	A 6 1 K 47/48	Z
45/00	A B C	9051-4C	48/00	A B S
45/05	A G B	9454-4C	49/00	A
45/08	A C B	8415-4C	C 0 7 D 495/04	1 0 3
47/48		9356-4H	C 0 7 K 14/465	
48/00	A B S	0276-2J	G 0 1 N 33/566	
49/00		0276-2J	33/15	Z
51/00	A D P	0276-2J	33/574	Z
C 0 7 D 495/04	1 0 3	9051-4C	A 6 1 K 37/36	A B G
C 0 7 K 14/465		9051-4C	37/66	A B A G
G 0 1 N 33/566		9051-4C	37/547	A A B
// G 0 1 N 33/15		8415-4C	43/00	A D P
33/574		9051-4C	37/24	A B L
(72)発明者	マレット ロバート ダブリュ アメリカ合衆国、ワシントン 98133、シ アトル、ストーン レイン エヌ ナンバ ーエッチ-102 15101			
(72)発明者	カジナ サダカー アメリカ合衆国、ワシントン州 98034 カーランド、エヌ イー、アハンドレッ ド フィフティーン ス アベニュー 13710			
(72)発明者	レノ ジョン エム アメリカ合衆国、ワシントン州 98036 ブライアー、エルム ドライブ 2452			
(72)発明者	アクスワーシー ドナルド ビー アメリカ合衆国、ワシントン州 98036 ブライアー、エス ダブリュ、トゥーハン ドレッドトゥウェンティセブンス ストリ ート 3615			
(72)発明者	ガスタフソン リンダ エム アメリカ合衆国、ワシントン州 98155 シアトル、エヌ イー、サーティーファ ースト ストリート 19809			